

**Regulation und Funktion von
Ubiquitin-ähnlichen Proteinen
im Rahmen der zellulären Immunantwort**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Nicole Lange

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter-Michael Klotzel
2. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel
3. Prof. Dr. Harald Saumweber

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2011

Zusammenfassung.....	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine	6
1.1.1 Ubiquitin.....	6
1.1.1.1 Die Ubiquitin-Enzymkaskade – Ubiquitinierung	7
1.1.1.2 Funktionen der Ubiquitinierung	8
1.1.2 Ubiquitin-ähnliche Proteine.....	10
1.1.2.1 SUMO	10
1.1.2.2 FAT10	11
1.1.3 ISG15.....	12
1.1.3.1 Die ISG15-Enzymkaskade – ISGylierung.....	13
1.1.3.2 Funktionen von ISG15 und ISG15-Konjugaten	15
1.2 Das Interferon System.....	19
1.2.1 Die Virale Infektion.....	20
1.2.2 Typ I Interferon – Interferon- α und - β	22
1.2.3 Typ II Interferon – Interferon- γ	23
1.3 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Chemikalien	25
2.2 Zellbiologische Methoden.....	25
2.2.1 Zelllinien und Medien	25
2.2.2 Zellkultivierung	26
2.2.3 Einfrieren und Auftauen	26
2.2.4 Interferonstimulation	27
2.2.5 Transfektion von Plasmid-DNA.....	27
2.2.6 Transfektion von siRNA.....	28
2.3 Biochemische Methoden	29
2.3.1 Antikörpergenerierung	29
2.3.2 Zellaufschluss.....	29
2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	30

2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.3.5	Coomassiefärbung	30
2.3.6	Western Blot und Immundetektion.....	31
2.3.7	Immunpräzipitation	32
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	33
2.4.2	cDNA-Synthese	33
2.4.3	Klonierung von Plasmid-DNA	33
2.4.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.4.3.2	Restriktion von DNA.....	34
2.4.3.3	Agarosegelelektrophorese	34
2.4.3.4	Aufreinigung von DNA und PCR-Produkten.....	35
2.4.3.5	Ligation	35
2.4.3.6	Transformation von Plasmid-DNA	35
2.4.3.7	TOPO-TA-Cloning®	36
2.4.3.8	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E.coli</i>	36
2.4.4	Real-time PCR.....	36
2.4.5	Affimetrix Microarray	37
2.5	Software und Datenbanken	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Spezifität des generierten ISG15-Antikörpers.....	39
3.2	Zelllinienvergleich.....	40
3.3	Regulation von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach Interferon Stimulation	42
3.3.1	Kinetische Analyse von ISG15 und ISG15-Konjugaten auf Translationsebene	42
3.3.2	Kinetische Analyse der an der ISGylierung beteiligten Enzyme auf Translationsebene	43
3.3.3	Analyse der Expression von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme auf Transkriptionsebene	44
3.4	Spezifität der IFN- γ Induktion.....	46
3.5	Enzymbeteiligung an der IFN- γ vermittelten ISGylierung	47

3.5.1	Einfluss von UBE2L6.....	47
3.5.2	Einfluss von TRIM25	48
3.5.3	Einfluss von Herc5	50
3.6	Identifizierung von E3-Ligasen.....	51
3.6.1	Immunpräzipitation mit HA-UBE2L6.....	52
3.6.2	Microarray-Analyse von Interferon regulierten E3-Ligasen	53
3.6.3	Mit UBE2L6 interagierende E3-Ligasen.....	54
3.6.4	siRNA-screen	54
3.6.5	Kinetische Untersuchung der Expressionsinhibition von UBE3A und ARIH1	56
3.6.6	Überexpressionsanalyse von UBE3A und ARIH1	58
3.6.7	Überexpressionsanalyse von UBE2L6 und Herc5	59
3.6.8	Überexpressionsanalyse von UBE3A und ARIH1 in Abwesenheit von Herc5	61
4	Diskussion	64
4.1	Regulation von ISG15 und der ISGylierung nach Interferon Stimulation	64
4.2	Enzymbeteiligung an der IFN- γ vermittelten ISGylierung	67
4.3	Identifizierung von E3-Ligasen.....	69
4.4	Die potentiellen ISG15 E3-Ligasen UBE3A und ARIH1	70
4.5	Relevanz und Ausblick.....	72
5	Literatur.....	75
	Abkürzungsverzeichnis.....	81
	Publikationen.....	83
	Danksagung	85
	Eidesstattliche Erklärung	86

Zusammenfassung

Eine Infektion mit Pathogenen wie Bakterien oder Viren führt zur Induktion einer Immunantwort, um den Organismus zu schützen und die Infektion abzuwehren. Dabei spielt die frühe Induktion von immunstimulierenden Interferonen eine wichtige Rolle, da sie für die Expression von antibakteriell oder antiviral wirkenden Proteinen sorgen. Eines der am stärksten induzierten Gene nach Typ I Interferon Stimulation ist das *Interferon stimulated gene 15* (ISG15). ISG15 gehört zu den Ubiquitin-ähnlichen Proteinen und kann über eine Enzymkaskade, bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzymen, kovalent an zu modifizierende Proteine konjugiert werden. Sowohl freiem ISG15, als auch ISG15-Konjugaten konnten antivirale Funktionen nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von ISG15, der ISGylierung und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme vergleichend nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation untersucht.

In HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass ISG15 und ISG15-Konjugate nicht nur nach Typ I, sondern auch nach Typ II Interferon Stimulation gebildet werden. Die dabei beobachteten Unterschiede in der Menge der ISGylierten Proteine, konnten in Zusammenhang mit der unterschiedlich starken Expression der an der ISGylierung beteiligten Enzyme gebracht werden. Durch Inhibition der Expression der einzelnen Enzyme wurde weiterhin nachgewiesen, dass nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation das gleiche E2-Enzym (UBE2L6), aber unterschiedliche E3-Ligasen für die ISGylierung von Proteinen zuständig sind. Während die Bildung der ISG15-Konjugate nach Typ I Interferon Stimulation größtenteils von der E3-Ligase Herc5 abhängt, zeigten die Experimente, dass an der Typ II Interferon induzierten ISGylierung weitere noch nicht identifizierte ISG15 E3-Ligasen beteiligt sein müssen. Durch Microarray- und siRNA screen-Analysen konnten die zwei potentiellen ISG15 E3-Ligasen UBE3A und ARIH1 identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass UBE3A nach Typ I und ARIH1 nach Typ II Interferon Stimulation einen Einfluss auf die ISGylierung von Proteinen haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass in HeLa Zellen sowohl Typ I als auch Typ II Interferone die Konjugation von ISG15 an Proteine induzieren können und sich die ISGylierung zwischen den Interferonen auf Ebene der E3-Ligasen unterscheidet. Diese Ergebnisse geben neue Einblicke in die Regulation der Interferon vermittelten ISGylierung und unterstreichen die Wichtigkeit der Bildung von ISG15 und ISG15-Konjugaten innerhalb einer Immunantwort.

1 Einleitung

1.1 Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine

Proteine werden als Bausteine des Lebens bezeichnet, da sie die unterschiedlichsten und vielfältigsten Aufgaben in jeder Zelle und im ganzen Organismus übernehmen. Die funktionelle Vielfalt der Proteine beruht nicht nur auf ihrer jeweils einzigartigen Sequenz oder der nachfolgenden Faltung, sondern wird auch maßgeblich durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Diese können sehr vielfältig sein und reichen beispielsweise von der Bildung von Disulfidbrücken über das Anlagern von kleinen funktionellen Gruppen (Phosphorylierung, Glykosylierung oder Acetylierung) bis hin zur Modifikation mit Proteinen. Bei den Proteinen, die kovalent über eine Isopeptidbindung an die zu modifizierenden Proteine geknüpft werden, handelt es sich um Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine wie z.B. SUMO, FAT10 oder ISG15.

1.1.1 Ubiquitin

Das 76 Aminosäuren lange Polypeptid Ubiquitin, ist das am stärksten konservierte Protein in eukaryotischen Organismen. Im Jahre 1975 wurde es erstmalig als ubiquitär exprimiertes Protein beschrieben (Goldstein et al 1975). In den darauf folgenden Jahren konnte dann gezeigt werden, dass Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion kovalent an Proteine gebunden wird und die so modifizierten Proteine, Substrate für eine ATP-abhängige Proteolyse darstellen (Ciechanover et al 1980, Ciechanover et al 1984, Hershko et al 1980). Der Prozess der kovalenten Verknüpfung von Ubiquitin mit zellulären Proteinen wird Ubiquitinierung genannt und erfolgt mit Hilfe einer Enzymkaskade. Dabei entsteht eine Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins (Gly76) und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im zu ubiquitinierenden Protein. Ubiquitin kann sowohl als Monomer, als auch als Polyubiquitin-Kette an Proteine gebunden werden. Die Verknüpfung der einzelnen Ubiquitine in einer Polyubiquitin-Kette erfolgt über dessen interne Lysine. Da Ubiquitin über sieben Lysine verfügt (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 und Lys63), können Polyubiquitin-Ketten gebildet werden, die über die verschiedenen Lysine miteinander verknüpft sind. Die Tatsache, dass Proteine sowohl mit Ubiquitinmonomeren als auch mit unterschiedlichen Formen von Polyubiquitin-Ketten modifiziert werden können, führt zu einer Vielfalt von Möglichkeiten die Funktion und/ oder die zelluläre Lokalisation des ubiquitinierten Proteins zu verändern (Komander 2009).

1.1.1.1 Die Ubiquitin-Enzymkaskade – Ubiquitinierung

Um Ubiquitin kovalent an zelluläre Proteine zu binden, bedarf es einer Enzymkaskade, die die Übertragung von Ubiquitin katalysiert. Diese Kaskade besteht aus drei Enzymen: dem Ubiquitin-aktivierenden (E1), dem -konjugierenden (E2) und dem -ligierenden (E3) Enzym (Abbildung 1, (Hershko & Ciechanover 1992)).

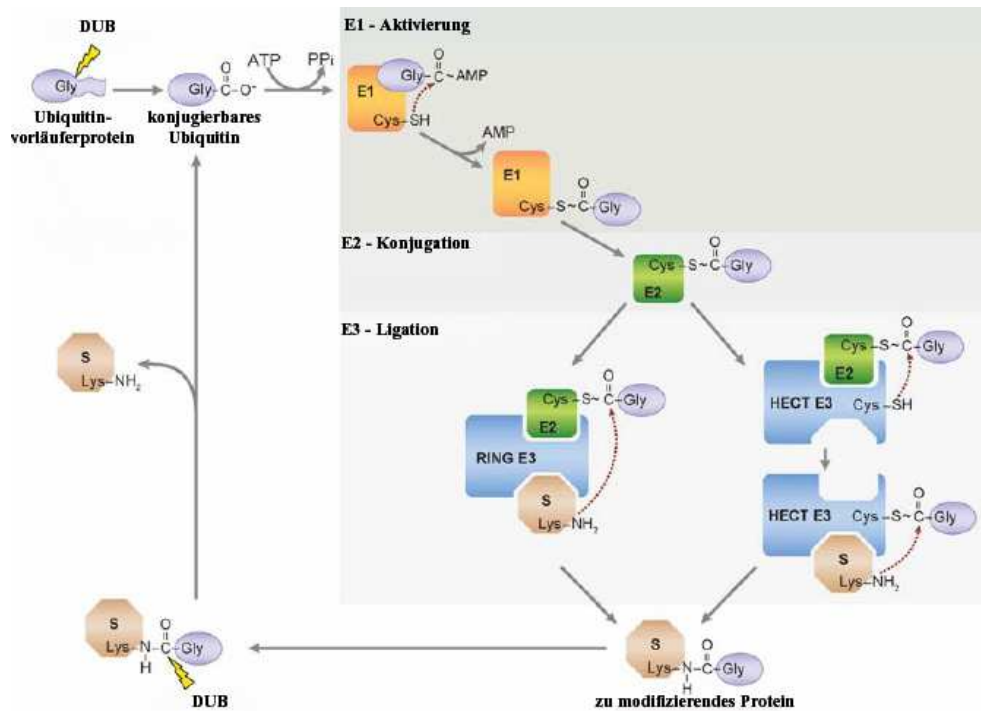


Abbildung 1: Ubiquitin-Enzymkaskade

Ubiquitin wird als Vorläuferprotein synthetisiert und anschließend von deubiquitinierenden Enzymen (DUBs) prozessiert. Das so entstandene Ubiquitin wird durch ein aktivierendes Enzym (E1) gebunden und aktiviert. Anschließend wird das Ubiquitin auf ein konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Im letzten Schritt vermittelt ein E3-Enzym die Bildung der Isopeptidbindung zwischen dem Gly76 des Ubiquitins und der ε-Aminogruppe eines Lysins im zu ubiquitinierenden Protein. Da der Prozess der Ubiquitinierung reversibel ist, kann das Ubiquitin durch DUBs wieder abgespalten werden. (modifiziert nach (Kerscher et al 2006))

Das humane Genom codiert für zwei E1-, 37 E2- und über 600 E3-Enzyme. Der Prozess der Ubiquitinierung beginnt mit der ATP-abhängigen Aktivierung von Ubiquitin durch das E1-Enzym. Dabei bindet das E1-Enzym zuerst ATP und dann Ubiquitin und katalysiert die Bildung eines C-terminalen Ubiquitin-Adenylats unter Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i). Das entstandene Ubiquitin-Adenylat ist nun in der Lage eine energiereiche Thioesterbindung mit dem Cystein im aktiven Zentrum des E1-Enzyms einzugehen, wobei AMP freigesetzt wird (Haas et al 1983). Im nächsten Schritt wird das E1-gebundene Ubiquitin auf ein E2-Enzym

übertragen. Dabei geht das Ubiquitin eine Thioesterbindung mit dem Cystein im aktiven Zentrum des E2-Enzyms ein. Im letzten Schritt katalysiert ein E3-Enzym die Bildung der Isopeptidbindung zwischen dem Gly76 des Ubiquitins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im zu ubiquitinierenden Protein (Pickart 2001). E3-Ligasen werden in drei Gruppen unterteilt: die *homologous to E6-associated protein C-terminus* (HECT), die *really interesting new gene* (RING) und die *UFD2-homology domain* (U-box) Domänen E3-Enzyme (Deshaies & Joazeiro 2009, Hatakeyama et al 2001, Hochrainer et al 2005). RING- und U-Box-Domänen E3-Enzyme binden sowohl das E2-Enzym, welches Ubiquitin gebunden hat, als auch das zu ubiquitinierende Protein. Die Übertragung des Ubiquitins erfolgt dann direkt vom E2-Enzym auf das zu ubiquitinierende Protein. Bei den HECT-Domänen E3-Enzymen wird Ubiquitin erneut über eine Thioesterbindung mit dem Cystein im aktiven Zentrum des HECT-Enzyms gebunden und erst dann auf das zu ubiquitinierende Protein übertragen. Die Bildung von Polyubiquitin-Ketten geschieht dann entweder sequentiell oder „en bloc“. Bei der sequentiellen Ubiquitinierung wird durch die Wiederholung der Enzymkaskade die Polyubiquitin-Kette schrittweise verlängert. Polyubiquitin-Ketten können aber auch erst an einem E2-Enzym gebildet und dann als ganze Kette, also „en block“, übertragen werden (Deshaies & Joazeiro 2009).

Eine weitere Familie von Enzymen spielt eine große Rolle im Prozess der Ubiquitinierung – die deubiquitinierenden Enzyme (DUBs). Diese erfüllen zwei wichtige Funktionen. Zum einen wird Ubiquitin in einer Vorläuferform exprimiert und muss mit Hilfe der DUBs prozessiert werden und zum anderen ist die Ubiquitinierung ein reversibler Prozess, d.h. Monoubiquitine oder Polyubiquitin-Ketten können durch DUBs wieder von Proteinen abgespalten werden (Komander et al 2009).

1.1.1.2 Funktionen der Ubiquitinierung

Die Funktion und/ oder die Lokalisation eines zellulären Proteins kann durch die Art und Form der Modifikation mit Ubiquitin verändert werden. Dabei unterscheidet man zwischen Monoubiquitinierung, Multi-Monoubiquitinierung und Polyubiquitinierung, wobei letztere noch weiter unterteilt werden kann (Abbildung 2).

Die am häufigsten auftretende Ubiquitinmodifikation ist die homotypische Polyubiquitinierung von Proteinen mit Lys48-Ketten. Dabei werden Proteine mit einer Kette aus mindestens vier Ubiquitinen, die über Lys48 verknüpft sind, verbunden. Dies stellt ein Signal für den Abbau des

Proteine durch das Proteasom abgebaut (Chau et al 1989). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch die Formation von Lys11-Ketten Proteine für den Abbau über das Proteasom markiert. Dabei spielen Lys11-Ketten im Endoplasmatischen Retikulum assoziierten Proteinabbau (ERAD) und in der Zellzyklusregulation eine große Rolle (Jin et al 2008, Xu et al 2009). Proteine die mit Lys63-Ketten verbunden sind, werden nicht zwangsläufig über das Proteasom abgebaut. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass sie ein wichtiges Signal in Prozessen wie der Endozytose, in Signalkaskaden oder der DNA-Reparatur darstellen (Chen & Sun 2009). Einige weniger häufig auftretende homotypische Polyubiquitinierungen sind die Lys6-Ketten, welche eine Rolle in der DNA-Reparatur spielen sollen, die Lys29- und Lys33-Ketten, welche bei der Regulation von Kinasen involviert sind und die Lys27-Ketten, deren Funktion allerdings noch ungeklärt ist (Komander 2009). Eine wichtige physiologische Funktion übernehmen die linearen Ubiquitinketten, da diese Art der Modifikation essentiell für die Aktivierung des NF-κB Signalweges ist (Kirisako et al 2006).

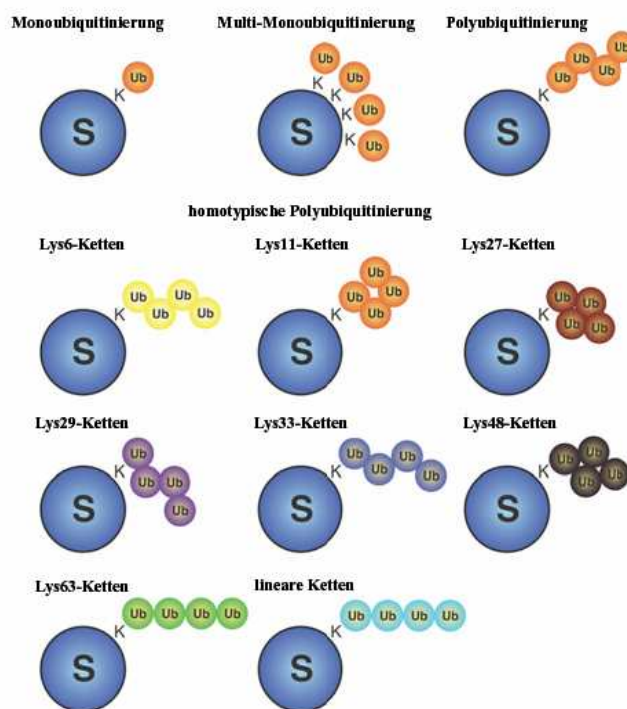


Abbildung 2: Formen der Ubiquitinierung

Innerhalb einer Zelle können die Formen der Modifikationen mit Ubiquitin sehr vielfältig sein. Generell unterteilt man sie in Monoubiquitinierung, Multi-Monoubiquitinierung und Polyubiquitinierung. (modifiziert nach (Komander 2009))

Nicht nur die unterschiedlichen Formen der Polyubiquitinierung, sondern auch Mono- und Multi-Monoubiquitinierungen erfüllen wichtige Aufgaben innerhalb einer Zelle. Monoubiquitinierungen spielen beispielsweise eine Rolle in DNA-Reparaturprozessen, welches Anhand der monoubiquitinierten Proteine *Histon 2A* (H2A) oder des *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) nachgewiesen werden konnte (Bergink et al 2006, Hoege et al 2002). Ein weiteres Beispiel ist die Virus-Replikation an deren Ende sich die neu synthetisierten viralen Bestandteile an der Plasmamembran sammeln und durch Virus-Knospung (virus-budding) neue infektiöse Viren freisetzen. Dies geschieht jedoch nur, wenn das virale Protein *p6-group-antigen* (p6-Gag) monoubiquitiniert wird (Patnaik et al 2000). Beispiele für Multi-Monoubiquitinierungen sind *Rezeptor Tyrosin Kinasen* (RTKs) und die *Phospholipase D1* (PLD1). Im Fall der RTKs wird durch die Multi-Monoubiquitinierung deren Endozytose sowie der nachfolgende lysosomale Abbau eingeleitet (Haglund et al 2003). PLD1 ist ein membran-assoziiertes Protein, welches in unstimulierten Zellen am Golgi-Komplex oder an frühen Endosomen detektierbar ist und durch Zellstimulation an die Plasmamembran gelangt. Es konnte gezeigt werden, dass PLD1 multi-monoubiquitiniert wird und es wird spekuliert, dass die Multi-Monoubiquitinierung ein Signal für den intrazellulären Transport von PLD1 zur Plasmamembran darstellt (Yin et al 2010).

1.1.2 Ubiquitin-ähnliche Proteine

Neben Ubiquitin existiert die Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine (ubiquitin-like proteins, UBLs) zu der unter anderem SUMO, FAT10 und ISG15 gehören. Alle bis jetzt bekannten UBLs weisen nicht nur eine Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin auf, sondern besitzen auch das typische Ubiquitin-Faltungsmuster (β -grasp fold). Weiterhin werden UBLs mittels einer Enzymkaskade über ihr C-terminales Glycin kovalent an zu modifizierende Proteine geknüpft (Hochstrasser 2009).

1.1.2.1 SUMO

Eines der bislang an besten untersuchten UBLs ist der *Small Ubiquitin-related Modifier* (SUMO). In Vertebraten gibt es vier SUMO-Formen, SUMO-1, -2, -3 und SUMO-4, wobei nur die ersten drei Formen ubiquitär exprimiert werden und in der Lage sind eine kovalente Bindung zu anderen Proteinen einzugehen. Da die Sequenzen zwischen SUMO-2 und SUMO-3 zu 95%, im Vergleich zu SUMO-1 aber nur zu 45% identisch sind, unterteilt man sie in die Sub-

Familien SUMO-1 und SUMO-2/3. Des Weiteren unterscheiden sich SUMO-1 und SUMO-2/3 aufgrund ihrer zellulären Konzentration und Lokalisation, der Fähigkeit SUMO-Ketten zu bilden, sowie der Proteine die sie modifizieren. Interessanterweise werden alle drei SUMO-Formen über die gleiche Enzymkaskade an zu modifizierende Proteine gebunden. Diese Enzymkaskade besteht aus dem heterodimeren E1-Enzym Aos1-Uba2, dem E2-Enzym Ubc9, einer Reihe von E3-Ligasen, die größtenteils zu den *protein inhibitor of activated STAT* (PIAS-Proteinen) gehören, sowie den *Sentrin-specific proteases* (SENPs-Proteinen) die SUMO prozessieren und SUMOylierte Proteine dekonjugieren können. In den letzten Jahren wurden viele mit SUMO modifizierte Proteine identifiziert und es konnte dadurch gezeigt werden, dass SUMO an Prozessen wie der Transkription, der DNA-Reparatur, der DNA-Replikation oder des intrazellulären Transports beteiligt ist (Geiss-Friedlander & Melchior 2007, Wang & Dasso 2009).

1.1.2.2 FAT10

Ein weiteres Ubiquitin-ähnliches Protein ist das 18kDa große *human leukocyte antigen F-associated adjacent transcript 10* (FAT10). FAT10 ist auch unter dem Namen Diubiquitin bekannt, da es aus zwei hintereinander angeordneten Ubiquitin-ähnlichen Domänen aufgebaut ist, die in Sequenz und Struktur einem Diubiquitin ähneln. Im Gegensatz zu Ubiquitin wird FAT10 nicht als Vorläufermolekül, sondern gleich in seiner konjugierbaren Form mit einem C-terminalen Diglycin-Motiv exprimiert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass UBA6 neben UBE1 nicht nur ein Ubiquitin-spezifisches E1-Enzym ist, sondern das UBA6 auch die Aktivierung von FAT10 übernimmt (Chiu et al 2007). Ähnlich verhält es sich mit USE1, welches in der Lage ist sowohl als E2-Enzym für Ubiquitin als auch als E2-Enzym für FAT10 zu fungieren. Bislang wurden aber weder FAT10 E3-Ligasen noch Proteine die mit FAT10 modifiziert werden können, identifiziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass FAT10 als proteasomales Abbausignal fungiert, sowie selbst vom Proteasom abgebaut wird und dass *Nedd8 ultimate buster 1-long* (NUB1L) diesen Abbau beeinflusst (Schmidtke et al 2006). Man nimmt weiterhin an, dass FAT10 eine Rolle in der Immunantwort spielt, da dessen Expression in Immunzellen wie dendritischen Zellen und reifen B-Zellen, sowie nach Stimulation verschiedener Zelllinien mit TNF- α und IFN- γ induziert wird (Bates et al 1997, Raasi et al 1999). Die Beobachtung, dass Mäuse die kein FAT10 exprimieren (FAT10 knockout Mäuse) anfälliger gegenüber Endotoxinen sind, unterstützt weiterhin diese Vermutung (Canaan et al

2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass FAT10 eine Rolle in der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges spielt (Gong et al 2010).

1.1.3 ISG15

Interferon stimulated gene 15 (ISG15) ist das erste identifizierte Mitglied der Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, welches auch unter dem Namen *Ubiquitin Cross-Reactive Protein* (UCRP) bekannt ist (Haas et al 1987). Die Expression von ISG15 wird sehr stark durch Typ I Interferone (IFN- α und IFN- β), sowie durch virale und bakterielle Infektionen induziert (Ebstein et al 2009, Liu et al 2009, Loeb & Haas 1992). In weitaus geringerem Maß ist Typ II Interferon (IFN- γ) in der Lage die Expression von ISG15 zu induzieren, dies konnte für die humane Zelllinie A-549, sowie für *human cornea stromal cells* (humane Keratozyten) nachgewiesen werden (Haas et al 1987, Taylor et al 1996).

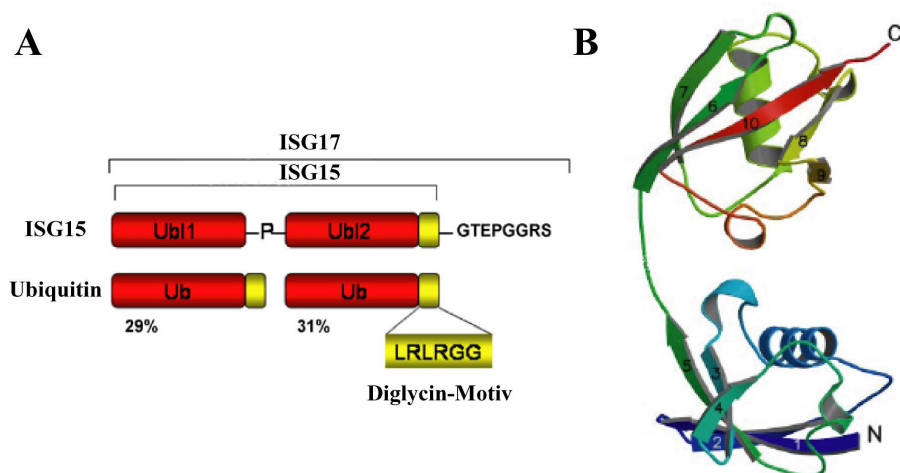


Abbildung 3: Struktur von ISG15

A) Primärstruktur von ISG15. ISG15 wird als Vorläuferprotein (ISG17) exprimiert. Durch Prozessierung der letzten 8 C-terminalen Aminosäuren entsteht ISG15, welche aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Ubiquitin-ähnlichen Domäne aufgebaut ist (modifiziert nach (Andersen & Hassel 2006)) **B)** Kristallstruktur von ISG15. Beide Domänen weisen das typische Ubiquitin-Faltungsmuster (β -grasp fold) auf und sind über sechs Aminosäuren, den so genannten Linker, miteinander verbunden (modifiziert nach (Narasimhan et al 2005))

Ähnlich wie Ubiquitin wird auch ISG15 als Vorläufermolekül (ISG17) exprimiert und erreicht erst seine konjugierbare Form durch die Prozessierung mittels DUBs. Das prozessierte ISG15 ist ein 156 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 15kDa, welches wie FAT10 aus zwei hintereinander angeordneten Ubiquitin-ähnlichen Domänen besteht. Sowohl die N-terminale, als auch die C-terminale Domäne weisen mit 29% bzw. 31% eine hohe

Identität zu Ubiquitin auf und die Kristallstruktur zeigt, dass beide Domänen das typische Ubiquitin-Faltungsmuster (β -grasp fold) einnehmen (Abbildung 3, (Narasimhan et al 2005)).

1.1.3.1 Die ISG15-Enzymkaskade – ISGylierung

Analog zu Ubiquitin wird auch ISG15 in einem Prozess der ISGylierung genannt wird, kovalent über eine Enzymkaskade auf zu modifizierende Proteine übertragen (Abbildung 4).

ISG15 besitzt in seiner Promotorregion regulatorische *interferon-stimulated response elements* (ISRE-Sequenzen) (Martensen & Justesen 2004, Reich et al 1987), an die die *Interferon-regulatorischen Faktoren* (IRF) IRF3 und IRF9 nach Typ I Interferon Stimulation binden (Au et al 1995, Nakaya et al 2001).

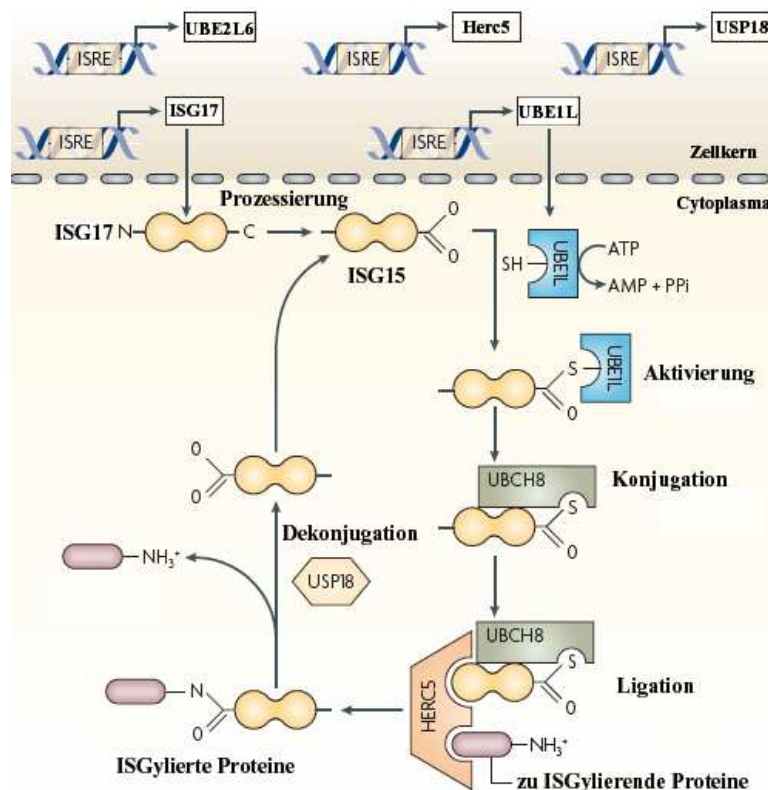


Abbildung 4: ISG15-Enzymkaskade

Durch z.B. Typ I Interferon Stimulation wird die ISRE-vermittelte Expression aller an der ISGylierung beteiligten Enzyme induziert. Nach der Prozessierung von ISG17 wird das generierte ISG15 mittels UBE1L aktiviert. Am nachfolgenden Konjugationsschritt sind die E2-Enzyme UBE2L6 (UbcH8) und UBE2E1 (UbcH6) beteiligt. Die Ligation von ISG15 an zu ISGylierende Proteine erfolgt dann durch die E3-Enzyme Herc5 und TRIM25. USP18 übernimmt als ISG15 spezifisches DUB sowohl die Prozessierung von ISG17, als auch die Dekonjugation von bereits ISGylierten Proteinen (modifiziert nach (Sadler & Williams 2008)).

In einem DUB vermittelten Prozessierungsschritt, werden die letzten acht C-terminalen Aminosäuren von ISG17 abgespalten, um ISG15 mit einem C-terminalen Diglycin-Motiv zu generieren. Das Diglycin-Motiv ist essentiell für die Bildung der Isopeptidbindung zwischen ISG15 und der ϵ -Aminogruppe eines Lysins im zu ISGylierenden Protein. Als nächstes wird ISG15 in einer ATP-abhängigen Reaktion über eine energiereiche Thioesterbindung an das E1-Enzym UBE1L gebunden, wobei gezeigt werden konnte, dass UBE1L spezifisch mit ISG15, jedoch nicht mit Ubiquitin reagiert (Yuan & Krug 2001). Im nächsten Schritt wird ISG15 auf ein konjugierendes Enzym übertragen. Derzeit sind UBE2L6 (UbcH8) und UBE2E1 (UbcH6) als ISG15 E2-Enzyme bekannt. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass UBE2L6 das Haupt-E2-Enzym ist und UBE2E1 eine eher untergeordnete Rolle spielt. Interessanterweise sind beide Proteine in der Lage sowohl während der Ubiquitinierung, als auch während der ISGylierung als E2-Enzyme zu fungieren, was für eine Vernetzung (cross-talk) der beiden Wege spricht (Takeuchi et al 2005, Zhao et al 2004). Im letzten Schritt der ISGylierung wird ISG15 durch die E3-Ligasen TRIM25 und Herc5 kovalent an ein zu modifizierendes Protein gebunden. TRIM25 oder auch *estrogen-responsive finger protein* (EFP) genannt, gehört zu den RING-Domänen E3-Enzymen. TRIM25 ist mit Hilfe von UBE2L6 für die Ligation von ISG15 an 14-3-3- σ verantwortlich (Zou & Zhang 2006). Ebenso wie die beiden E2-Enzyme spielt TRIM25 nicht nur während der ISGylierung, sondern auch während der Ubiquitinierung eine Rolle. *HECT domain and RCC1-like domain containing protein 5* (Herc5) wird den HECT-Domänen E3-Enzymen zugeordnet. In siRNA- und Präzipitationsexperimenten wurde nachgewiesen, dass Herc5 zusammen mit UBE2L6 für die Ligation von ISG15 an den größten Teil der zu modifizierenden Proteine verantwortlich ist, wohingegen TRIM25 anscheinend nur die Ligation von ISG15 an spezielle Proteine übernimmt und somit eine eher untergeordnete Rolle im Prozess der ISGylierung spielt (Dastur et al 2006, Takeuchi et al 2006a). Für alle an der ISGylierung beteiligten Enzyme konnte gezeigt werden, dass sie Typ I Interferon induzierbar sind. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die C-terminale Domäne von ISG15 essentiell für die Schritte der Aktivierung und Konjugation ist. Es wird vermutet, dass die N-terminale Domäne eine regulatorische Funktion für die Bindung von E3-Ligasen und während des Transfers von ISG15 auf zu modifizierende Proteine übernimmt (Chang et al 2008).

ISG15 wird zwar kovalent an zelluläre Proteine gebunden, jedoch kann es auch wieder von diesen abgespalten werden. Das deubiquitinierende Enzym USP18 (UBP43) ist die einzige charakterisierte ISG15-spezifische Protease die sowohl ISG15 aus seiner Vorläuferform prozessieren, als auch kovalent gebundenes ISG15 von Proteinen abspalten kann (Malakhov et

al 2002). Die Beobachtung, dass es in Mäusen die kein USP18 exprimieren (USP18 knockout Mäuse) zu einer Akkumulation von ISG15-Konjugaten kommt, lässt darauf schließen, dass es noch andere DUBs geben muss, die zumindest für die Prozessierung von ISG17 zuständig sind. In Experimenten zur Klassifizierung von DUBs konnten die vier Proteasen USP2, USP5, USP13 und USP14 als mögliche ISG15 DUBs identifiziert werden (Catic et al 2007).

Des Weiteren wird ISG15 als Monomer und nicht als Poly-ISG15-Kette auf zu modifizierende Proteine übertragen. Für *protein phosphatase 2C β* (PP2C β) konnte nachgewiesen werden, dass die zwei höhermolekularen Proteinbanden durch die Mono-ISGylierung von Lys12 und Lys142 im PP2C β Protein zustande kommen (Takeuchi et al 2006b). Auch für das *nonstructural protein 1* (NS1-Protein) des Influenza A Virus konnte kürzlich gezeigt werden, dass Lys126 und Lys217 im NS1 Protein Mono-ISGyliert werden (Tang et al 2010).

1.1.3.2 Funktionen von ISG15 und ISG15-Konjugaten

Da ISG15 und dessen Konjugation an zelluläre Proteine sehr stark durch Typ I Interferone, sowie durch virale und bakterielle Infektionen induziert wird, wurde schon früh darauf geschlossen, dass ISG15 eine wichtige Rolle während der Immunantwort übernimmt. Dies wurde zusätzlich durch die Identifizierung von ISGylierten Proteinen bestätigt, die zum Teil selbst Typ I Interferon induzierbar sind oder wichtige regulatorische Funktionen im Typ I Interferon Signalweg übernehmen, wie PLC γ 1, JAK1, ERK1 und STAT1 (Malakhov et al 2003). Von den ca. 150 identifizierten ISGylierten Proteinen werden jedoch die meisten konstitutiv exprimiert und sind an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt, wie den unterschiedlichen Stoffwechselwegen, der Proteinsynthese oder dem Aufbau des Zytoskeletts, welche die möglichen Funktionen der ISGylierung erweitern (Giannakopoulos et al 2005, Zhao et al 2005). Im Gegensatz zu Ubiquitin, fungiert ISG15 jedoch nicht als proteasomales Abbausignal (Liu et al 2003).

Erste Untersuchungen von Mäusen, die kein ISG15 exprimieren (ISG15 knockout oder ISG15^{-/-} Mäuse), haben gezeigt, dass diese lebens- und fortpflanzungsfähig sind, keine offensichtlichen Abnormalitäten aufweisen und das keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellbestandteile der lymphatischen Organe im Vergleich zu ISG15 Wildtyp (ISG15^{+/+}) Mäusen bestehen. Des Weiteren zeigen mit *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) und *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (LCMV) infizierte ISG15^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ISG15^{+/+} Mäusen

weder eine Veränderung der Überlebensrate noch Defekte in der antiviralen Immunabwehr (Osiak et al 2005). Dieses Ergebnis stellte die Funktion von ISG15 als wichtiges Molekül während der Immunantwort in Frage. In weiteren Versuchen mit ISG15^{-/-} Mäusen, konnte jedoch gezeigt werden, dass diese empfindlicher als ISG15^{+/+} Mäuse auf Influenza A/WSN/33, Influenza B/Lee/40, Herpes (HSV-1) und Sindbis Virus Infektionen reagieren und die Überlebensrate von ISG15^{-/-} Mäusen im Fall der Sindbis Virus Infektion erhöht werden kann, wenn diese wieder ISG15 exprimieren (Lenschow et al 2007).

Darüber hinaus ist ISG15 in der Lage die Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel auf der Ebene der Virus-Knospung (virus-budding) zu inhibieren. Zwei Beispiele sind *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) und *avian sarcoma leukosis virus* (ASLV) für die gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von ISG15 die Freisetzung von HIV-1 und ASLV-Partikeln inhibiert. Die Virusfreisetzung funktioniert in beiden Fällen so, dass sich die viralen Gag-Proteine an der Zellmembran durch Interaktion mit dem membrangebundenen zellulären *endosomal sorting complex required for transport complex* (ESCRT-Komplex) sammeln und so die Virus-Knospung eingeleitet wird. Die endgültige Freisetzung neuer Viruspartikel erfolgt jedoch erst nach dem Zerfall des ESCRT-Komplexes. Dieser Zerfall wird durch die Oligomerisierung der zellulären Proteine *vacuolar protein sorting 4* (Vsp4) und *lysosomal trafficking regulator-interacting protein 5* (LIP5) und deren Bindung an den ESCRT-Komplex ermöglicht. Das zelluläre *chromatin-modifying protein 5* (CHMP5) reguliert wiederum die Interaktion zwischen Vsp4 und LIP5. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch ISGylierung von CHMP5 die Oligomerisierung von Vsp4 und LIP5 verhindert wird und somit der ESCRT-Komplex nicht zerfallen kann, was dazu führt, dass der ESCRT-Komplex an der Membran gebunden bleibt und die Freisetzung von Viruspartikeln nicht mehr stattfinden kann (Okumura et al 2006, Pincetic et al 2010). Im Fall von HIV-1 konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Ubiquitinierung des viralen p6-Gag Proteins und des zellulären Tsg101 Proteins, einer Komponente des ESCRT-Komplexes, in Anwesenheit von UBE1L und ISG15 verhindert wird. Die Ubiquitinierung von p6-Gag und Tsg101 ist jedoch für deren Interaktion essentiell und die Interaktion wiederum ist wesentlich für die Virus-Knospung (Okumura et al 2006). Damit wurden für HIV-1 zwei Mechanismen aufgeklärt, die zeigen, wie ISG15 in den Prozess der Virusreplikation als antivirales Molekül eingreift. Ein weiteres Beispiel für die Inhibition der Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel sind die *Ebola VP40 virus-like particle* (Ebola VP40 VLP's). Es wurde gezeigt, dass ISG15 die Ubiquitinierung des viralen Matrixproteins VP40 verhindert (Okumura et al 2008). VP40 wird durch die E3-Ligase Nedd4 ubiquitiniert und kann

dann mit dem zellulären Tsg101 interagieren, was zur Freisetzung von neuen Viruspartikeln führt. Freies ISG15 blockiert jedoch die Interaktion zwischen Nedd4 und einem Ubiquitin-E2-Enzym-Komplex und verhindert so die Ubiquitinierung von VP40 und somit die Viruspartikelfreisetzung (Malakhova & Zhang 2008). Ein weiteres Beispiel ist die eukaryotische Cap-abhängige Translation. Dabei bindet der *eukaryotischer Translations-Initiations-Faktor 4F* (eIF4F Komplex) an die Cap-Struktur der zu translatierenden mRNA und initiiert die Translation. Das Protein 4EHP kann ebenfalls an diese Struktur binden, jedoch mit einer geringeren Affinität als eIF4F, und kann somit als Suppressor wirken. Es konnte gezeigt werden, dass 4EHP ISGyliert wird und dies die Affinität von 4EHP zur Cap-Struktur erhöht, was den Effekt als Suppressor der Translation verstärkt. Es ist weiterhin bekannt, dass nach Interferonstimulation die Translation von viraler mRNA inhibiert werden kann, wohingegen die Translation der zellulären mRNA unbeeinflusst bleibt. Man nimmt daher an, dass dies ein Mechanismus sein könnte, der spezifisch die Cap-abhängige Translation von viraler mRNA inhibiert (Okumura et al 2007).

Viren haben allerdings auch Strategien und Mechanismen entwickelt, um der antiviralen Immunantwort zu entgehen, wobei auch die ISGylierung als Angriffspunkt dient. Beispielsweise ist das Influenza B Virus Protein *non-structural protein 1 of influenza B* (NS1B) in der Lage an ISG15 zu binden und blockiert so die Bildung einer Thioesterbindung zwischen UBE1L und ISG15, was wiederum zur Inhibition der ISGylierung führt (Yuan & Krug 2001). Weiterhin können Viren auch Proteasen enthalten, die wie DUBs ISG15 von Proteinen abspalten. Dies konnte beispielsweise für die *ovarian tumor domain containing protease* (OTU-Proteasen) von Nairoviren und Arteriviren gezeigt werden (Frias-Staheli et al 2007). Die Tatsache, dass Viren Mechanismen entwickelt haben, die gegen ISG15 und die ISGylierung gerichtet sind, spricht zusätzlich für eine wichtige Aufgabe von ISG15 während der Immunantwort.

ISG15 kann auch die Ubiquitinierung regulieren, wie das Beispiel der E3-Ligase Nedd4 während der Freisetzung von Ebola Viruspartikeln gezeigt hat. Weitere Beispiele einer solchen Regulation sind die E2-Enzyme UBE2E1 und Ubc13. UBE2E1 kann sowohl als E2-Enzym während der Ubiquitinierung als auch während der ISGylierung fungieren. In unstimulierten Zellen, also in Abwesenheit von ISG15, bildet UBE2E1 Ubiquitin-Konjugate. In Typ I Interferon stimulierten Zellen, also in Anwesenheit von ISG15 und der ISGylierungsmaschinerie, konnte jedoch gezeigt werden, dass ISG15 eine Thioesterbindung mit

UBE2L1 eingeht und so die Ubiquitinierung blockiert (Takeuchi et al 2005). Auch Ubc13 kann durch ISG15 modifiziert werden und verliert so seine E2-Enzym Aktivität für die Bildung von Ubiquitin-Konjugaten. Da Ubc13 zusammen mit der E3-Ligase Mms2 für die Bildung von Lys63-Ketten zuständig ist, beeinflusst ISG15 nicht nur direkt die Regulation der Ubiquitinierung, sondern auch indirekt Prozesse wie die Endozytose, Signalkaskaden und die DNA-Reparatur (Zou et al 2005).

Innerhalb der Tumorgenese konnte ISG15 sowohl eine Funktion als Tumor Suppressor als auch als onkogener Faktor nachgewiesen werden. Beispielsweise akkumuliert in *acute promyelocytic leukemia cells* (APL Zellen) das Onkogen *promyelocytic leukemia/ retic acid receptor α* (PML/RAR α). Werden diese Zellen mit Retinolsäure behandelt, dann wird die Expression von ISG15 und UBE1L induziert. Dies löst wiederum den Abbau von PML/RAR α aus und vermindert so dessen onkogene Effekte (Kitareewan et al 2002, Pitha-Rowe et al 2004). Andererseits konnte in vielen Tumoren und Tumorzelllinien eine erhöhte Expression von ISG15 und ISGylierten Proteinen nachgewiesen werden. Diese Erhöhung ist direkt an eine verminderte Ubiquitinierung geknüpft und man vermutet, dass ISG15 negativ die Ubiquitinierung und somit den Proteinabbau über das Proteasom reguliert (Desai et al 2006). Weiterhin ist bekannt, dass in vielen Tumoren der NF- κ B Signalweg, welcher für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und des Tottods zuständig ist, durchgängig aktiv ist und somit der Transkriptionsfaktor NF- κ B konstitutiv für die Expression seiner Zielgene sorgt. Normalerweise liegt NF- κ B gebunden an I κ B α im Cytosol vor. Werden Zellen jedoch z.B. mit TNF- α stimuliert, dann kommt es zur Phosphorylierung der Kinase *TGF- β -activated kinase 1* (TAK1), welche zusammen mit dem *TAK1-binding protein* (TAB1) interagiert. TAK1/TAB1 induzieren dann den Abbau von I κ B α , was dazu führt, dass NF- κ B in den Zellkern transloziert und dort die Expression seiner Zielgene induziert. Die *protein phosphatase 2C β* (PP2C β) dephosphoryliert TAK1 und wirkt so als Suppressor der TAK1/TAB1 vermittelten NF- κ B-Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass PP2C β Typ I Interferon abhängig ISGyliert wird und dass diese Modifikation die Funktion von PP2C β als Suppressor blockiert, was zu einer permanenten Aktivierung des NF- κ B Signalweges führt (Takeuchi et al 2006b). Dies zeigt zusätzlich, dass ISG15 und die ISGylierung auch innerhalb von Signalwegen regulatorische Funktionen übernehmen können.

ISG15 ist jedoch nicht nur ein intrazelluläres Protein, sondern kann auch extrazellulär als Cytokin fungieren. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass aus humanem Blut aufgereinigte Lymphozyten und Monozyten, sowie Zellen der humanen Zelllinie THP-1 nach Typ I Interferon Stimulation ISG15 ins Medium abgeben können und die Kinetik der ISG15-Freisetzung vergleichbar mit der Sekretion der Cytokine IL-1 α und IL- β aus Monozyten ist (Knight & Cordova 1991). Behandelt man CD3⁺, CD4⁺ oder CD8⁺ Lymphozyten mit ISG15, so sind diese in der Lage IFN- γ zu sezernieren (Recht et al 1991). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine ISG15 Behandlung von B-Zellen-depletierten Lymphozyten zudem die Proliferation von *natürlichen Killerzellen* (NK-Zellen) induziert und dass die lytische Aktivität von *lymphokinaktivierten Killerzellen* (LAK-Zellen) verstärkt wird (D'Cunha et al 1996). Des Weiteren haben *in-vitro* Untersuchungen von verschiedenen Klonen einer metastasierenden Zelllinie ergeben, dass diese in der Lage sind nach IFN- β Stimulation ISG15 zu sezernieren. Das sezernierte ISG15 induziert daraufhin die Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen (monocyte-derived dendritic cells) und bewirkt so eine Veränderung der Mobilität der dendritischen Zellen (Padovan et al 2002). Obwohl ISG15 als extrazelluläres Cytokin immunstimulatorische Funktionen besitzt, ist jedoch nicht klar, ob ISG15 über bekannte Sekretionswege oder durch Zelllyse aus der Zelle entlassen wird.

1.2 Das Interferon System

Cytokine sind kleine strukturell sehr vielfältige Proteine, die nach einem Immunstimulus von Zellen produziert und sezerniert werden können. Durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche anderer Zellen vermitteln sie Prozesse wie die Zellproliferation, Apoptose, Zellmigration oder die Hämatopoese und sind somit wichtige Immunmodulatoren der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr. Da Cytokine strukturell und funktionell recht heterogen sind, werden sie in fünf Hauptgruppen unterteilt: Interleukine, Chemokine, Tumornekrosefaktoren, koloniestimulierende Faktoren und Interferone.

Die Familie der Interferone (IFN) wird weiterhin in die drei Gruppen Typ I, Typ II und Typ III untergliedert, wobei allen die antivirale, antitumorale und immunmodulierende Aktivität gemeinsam ist. Zu den humanen Interferonen des Typs I gehören IFN- α , - β , - ϵ , - ω und - κ , des Typs III IFN- λ 1, - λ 2 und - λ 3 und das einzige Mitglied der Typ II Interferone ist IFN- γ (Takaoka & Yanai 2006).

1.2.1 Die Virale Infektion

Immunzellen wie Lymphozyten, dendritische Zellen oder Makrophagen sind in der Lage auf unterschiedlichen Wegen über zelleigene *pathogen-recognition receptors* (PRRs) virale Infektionen zu detektieren und daraufhin eine antivirale Antwort zu initiieren (Abbildung 5).

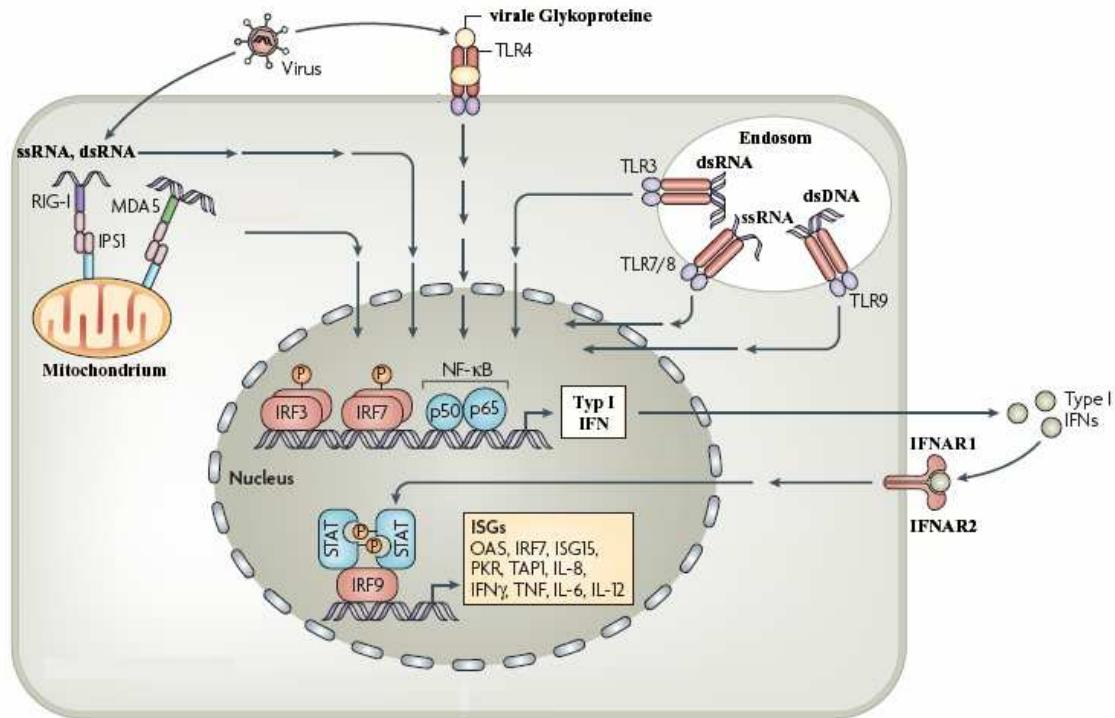


Abbildung 5: Typ I Interferon Netzwerk

Immunzellen können über zelleigene PPRs virale Infektionen detektieren. Die cytoplasmatische Erkennung von ssRNA und dsRNA erfolgt über RIG-1 und MDA5. Dies führt einerseits zur Aktivierung des NF-κB Signalwegs, sowie andererseits über IPS-1 zur Phosphorylierung von IRF3 und IRF7. Die extracytoplasmatische Erkennung im Endosom wird von TLR3, 7, 8 und 9 ausgeführt. TLR3 detektiert dsRNA und ist in der Lage den NF-κB Signalweg, sowie IRF3 und IRF7 zu aktivieren. TLR7 und 8 erkennen ssRNA und TLR9 bindet dsDNA. Alle drei Rezeptoren aktivieren MyD88-abhängig den NF-κB Signalweg und die Phosphorylierung von IRF7. Der TLR4 ist in der Zellmembran lokalisiert und erkennt extracytoplasmatisch virale Glycoproteine. Während in einer MyD88-abhängigen Reaktion der NF-κB Signalweg und IRF7 aktiviert werden, löst TLR4 in einer MyD88-unabhängigen Reaktion die Aktivierung von IRF3, IRF7 und den NF-κB Signalweg aus. Über den NF-κB Signalweg kommt es zu Transkription von inflammatorischen Cytokinen. Während IRF3 die Transkription von IFN-β, sowie einigen ISGs induziert, ist IRF7 für die Transkription von IFN-α und IFN-β verantwortlich. Die Typ I Interferone werden dann von der infizierten Zelle sezerniert und können an den IFNAR-1/ IFNAR-2 Rezeptorkomplex der gleichen Zelle (autokrin) oder umliegender Zellen (parakrin) binden. Dadurch kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ISGF3 und somit zur Transkription von ISGs (modifiziert nach (Katze 2008)).

Zu den PRRs gehören die RNA-Helikasen *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-1) und *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), die für die cytoplasmatische Erkennung

von viralen Infektionen zuständig sind und die *Toll-like receptors* (Transmembran-Rezeptoren, TLRs) TLR3, 4, 7, 8 und 9, welche die extracytoplasmatische Erkennung übernehmen, da sie auf der Zelloberfläche (TLR4) oder in Endosomen (TLR3, 7, 8, 9) lokalisiert sind (Billiau 2006). Die PRRs erkennen unterschiedliche *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs): RIG-1 und MDA5 binden Einzelstrang- und Doppelstrang-RNA (ssRNA, dsRNA), TLR3 erkennt dsRNA, die während der Replikation von RNA und DNA-Viren entsteht, TLR4 reagiert auf virale Glykoproteine, TLR7 und 8 binden ssRNA und TLR9 erkennt dsDNA. Durch die Bindung von PAMPs werden die TLRs aktiviert und lösen mittels ihrer cytoplasmatischen *Toll/interleukin-1 receptor domain* (TIR-Domäne) intrazelluläre Signalwege aus, die zur Induktion der antiviralen und immunmodulierenden Abwehr führen. Dies kann MyD88-abhängig oder MyD88-unabhängig geschehen (Katze et al 2008, Paun & Pitha 2007). Das Adaptorprotein *Myeloid Differentiation primary response gene 88* (MyD88) bindet an die TIR-Domäne von TLR7, 8 und 9 und interagiert weiterhin mit den Proteinen IRAK1, IRAK4, TRAF6 und IRF7, wobei es zur Phosphorylierung von IRF7 kommt. Anschließend dimerisiert phosphoryliertes IRF7 und transloziert in den Zellkern, wo es an *virus responsive elements* (VREs) der DNA bindet und die Transkription von IFN- α und IFN- β induziert. Des Weiteren wird auch der NF- κ B Signalweg MyD88-abhängig über TLR7, 8 und 9 aktiviert, was zur Transkription von inflammatorischen Cytokinen wie TNF α , IL-6, IL-12 oder auch IFN- β führt. TLR3 induziert MyD88-unabhängig eine antivirale Antwort. An die TIR-Domäne von TLR3 bindet das Adaptorprotein *TIR domain containing adaptor-inducing IFN- β* (TRIF), welches einerseits zusammen mit RIP-1 den NF- κ B Signalweg induzieren kann und andererseits zusammen mit TRAF3, TBK1 und IKK ϵ die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 vermittelt. Phosphoryliertes IRF3 und IRF7 homodimerisiert, transloziert in den Zellkern und bindet an VREs der DNA. Im Gegensatz zu IRF7 ist IRF3 nicht in der Lage die Transkription von IFN- α zu induzieren, jedoch ist IRF3 für die Induktion der Transkription von IFN- β und von einigen ISGs, darunter auch IRF7, verantwortlich. Dies ist dahingehend wichtig, weil nur IRF3 konstitutiv exprimiert wird und somit sofort nach viralen Infektionen die Induktion von Genen stimulieren kann, wohingegen IRF7 erst induziert werden muss. Der TLR4 kann einerseits MyD88-abhängig, wie die TLR7, 8 und 9, IRF7 und den NF- κ B Signalweg aktivieren. Andererseits ist TLR4 auch in der Lage MyD88-unabhängig über TRIF, wie TLR3, IRF3, IRF7 und den NF- κ B Signalweg auszulösen (Akira et al 2006, Paun & Pitha 2007). Neben der extracytoplasmatischen Virus Erkennung durch die TLRs gibt es noch die cytoplasmatische

Erkennung durch RIG-1 und MDA5. Beide besitzen *caspase-recruiting domains* (CARDs) über die sie an das mitochondriale Membranprotein *INF- β promoter stimulator 1* (IPS-1) binden können, welches dann zur Aktivierung von TBK1 und IKK ϵ und dadurch zur Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 führt. Andererseits können RIG-1 und MDA5 auch zusammen mit IPS-1 und RIP-1 den NF- κ B Signalweg auszulösen (Yoneyama et al 2005). Durch diese unterschiedlichen Wege sind Zellen in der Lage virale Infektionen zu detektieren und durch die kooperative Induktion von inflammatorischen Cytokinen, darunter auch IFN- α und IFN- β , eine antivirale Antwort zu initiieren.

1.2.2 Typ I Interferon – Interferon- α und - β

Die beiden am besten charakterisierten und wohl auch wichtigsten Typ I Interferone sind IFN- α und IFN- β . Das humane Genom codiert für 14 IFN- α Gene, aus deren Genprodukten 12 IFN- α Subtypen synthetisiert werden können, die sich in ihrer Sequenz und ihrer Aktivität voneinander unterscheiden. Alle IFN- α Subtypen binden und aktivieren in monomerer Form ihre Rezeptoren, wobei sie zum größten Teil nicht glycosyliert vorliegen. Im Gegensatz dazu codiert das humane Genom für nur ein IFN- β Gen. Das IFN- β Protein wird N-glycosyliert und liegt in seiner aktiven Form als Homodimer vor (Pestka et al 2004). Sowohl IFN- α als auch IFN- β binden an den gleichen Rezeptorkomplex, bestehend aus IFNAR-1 und IFNAR-2.

Das durch die virale Infektion gebildete IFN- α und IFN- β wird von den infizierten Zellen freigesetzt und kann dann an den IFNAR-1/IFNAR-2 Rezeptorkomplex derselben (autokrine Sekretion) oder umliegender Zellen (parakrine Sekretion) binden (Samuel 2001). IFNAR-1 und IFNAR-2 sind Transmembran-Rezeptoren an der Zelloberfläche, wobei die extrazellulären Domänen für die IFN- α oder IFN- β Bindung zuständig sind, während die intrazellulären Domänen mit den JAK-Kinasen *Janus-activated kinase 1* (JAK1) und *tyrosine kinase 2* (Tyk2) assoziiert vorliegen (Abbildung 6A). Binden IFN- α oder IFN- β an IFNAR-1 und IFNAR-2 kommt es zur Dimerisierung der beiden Rezeptoren, sowie zur Aktivierung der JAK-Kinasen, was zur Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription 1 und 2* (STAT1 und STAT2) führt. Die phosphorylierten STAT1 und STAT2 Proteine sowie IRF9 bilden dann zusammen den *Interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3). Der Transkriptionsfaktor ISGF3 transloziert in den Zellkern, bindet dort an das DNA-Sequenzmotiv ISRE und induziert so die Transkription von *interferon-stimulated genes* (Interferon-stimulierbaren Genen, ISGs). Viele der ISGs entfalten ihre antivirale Aktivität direkt wie z.B. *2',5'-oligoadenylate synthetase*

(2',5'-OAS), *RNA-dependent protein kinase* (PKR) oder ISG15, andere wiederum indirekt wie beispielsweise IRF7 oder IFN- γ (Sadler & Williams 2008). IFN- α und IFN- β sind auch für immunmodulatorische Effekte, wie der Expression von MHC I-Molekülen in Makrophagen oder der Differenzierung von dendritischen Zellen verantwortlich.

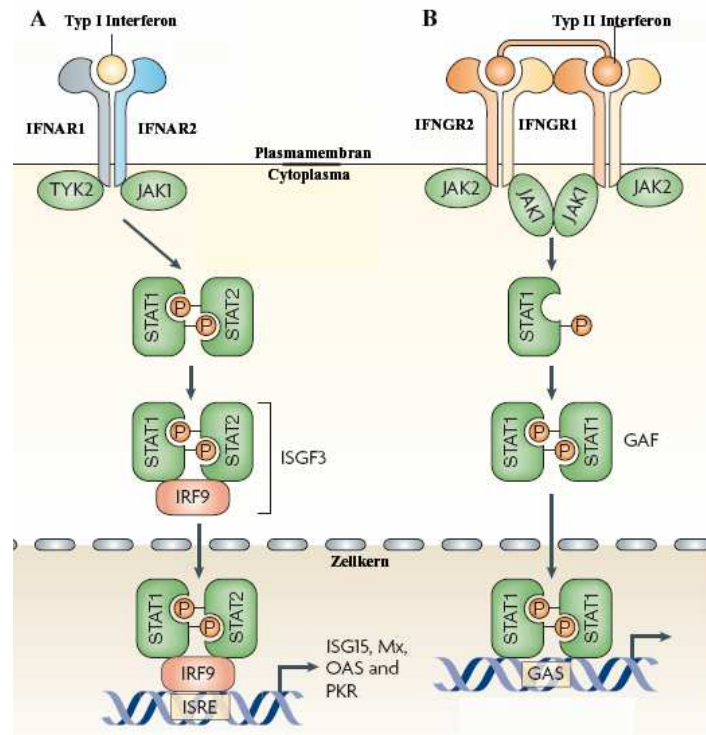


Abbildung 6: Interferon-Rezeptor-Signalwege

A) Durch die Bindung von IFN- α und IFN- β an den IFNAR-1/ IFNAR-2 Rezeptorkomplex kommt es zur Aktivierung der assoziierten Kinasen JAK1 und Tyk2. Dies führt dann zur Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 die zusammen mit IRF9 den Transkriptionsfaktor ISGF3 bilden. ISGF3 transloziert in den Zellkern, bindet an ISRE-Sequenzen in der DNA und führt zur Transkription von ISGs. **B)** Durch die IFN- γ Bindung an zwei IFN γ R1 und zwei IFN γ R2 kommt es zur Tetramerisierung des Rezeptorkomplexes und zur Aktivierung von JAK1 und JAK2, welches wiederum zur Phosphorylierung von STAT1 führt. Homodimerisieren zwei STAT1 Moleküle, dann wird der Transkriptionsfaktor GAS gebildet, der in den Zellkern transloziert und an das DNA-Sequenzmotiv GAS bindet. Durch diese Bindung wird die Transkription von IFN- γ stimulierbaren Genen induziert (modifiziert nach (Sadler & Williams 2008)).

1.2.3 Typ II Interferon – Interferon- γ

IFN- γ ist ein wichtiges immunmodulierendes Cytokin, welches direkt und indirekt eine große Rolle bei der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr, sowie bei inflammatorischen Prozessen spielt. Das von aktivierten Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen oder *antigen-presenting cells* (APCs) gebildeten IFN- γ wird N-glycosyliert und bindet als Tetramer an

jeweils zwei IFN γ R1 (IFNGR1) und zwei IFN γ R2 (IFNGR2) Rezeptoren (Abbildung 6B). Die intrazelluläre Domäne von IFN γ R1 ist mit JAK1 und die von IFN γ R2 ist mit JAK2 assoziiert (Shtrichman & Samuel 2001). Durch die Bindung von IFN- γ oligomerisieren die Rezeptoren und es kommt zur Aktivierung der assoziierten Kinasen, woraufhin STAT1 phosphoryliert wird. Zwei phosphorylierte STAT1 Proteine dimerisieren und bilden so den Transkriptionsfaktor *gamma activation factor* (GAF) der in den Zellkern transloziert, an das DNA-Sequenzmotiv *gamma activation site* (GAS) bindet und dadurch die Transkription von IFN- γ stimulierbaren Genen induziert (Gough et al 2008). Dazu gehören u. a. antivirale und antimikrobielle Proteine, Cytokine, Rezeptorproteine oder Transkriptionsfaktoren. IFN- γ induziert beispielsweise die Expression der Transkriptionsfaktoren IRF-1 und CIITA, die ihrerseits für die Transkription weiterer Gene sorgen. So ist IRF-1 für die Induktion von MHC Klasse I Genen zuständig, wohingegen CIITA die Expression von MHC Klasse II Genen kontrolliert. Dadurch wird die Antigen-Präsentation von intra- und extrazellulären Pathogenen erhöht. Des Weiteren ist IFN- γ in der Lage Makrophagen, Granulozyten und cytotoxische T-Zellen zu aktivieren, sowie die Cytotoxizität von NK-Zellen zu erhöhen (Schroder et al 2004).

1.3 Zielsetzung

Eines der am stärksten induzierten Gene nach viralen und bakteriellen Infektionen, sowie nach Typ I Interferon Stimulation ist ISG15. Nicht nur die Expression von freiem ISG15, sondern auch die Konjugation von ISG15 an zu modifizierende Proteine spielen dabei eine wichtige Rolle innerhalb der Immunantwort. Während über die Regulation und Funktion von ISG15, der Enzymkaskade und der ISGylierung von Proteinen nach Typ I Interferon Stimulation schon sehr viel bekannt ist, gibt es nahezu keine Studien über den Einfluss des Typ II Interferon IFN- γ .

Innerhalb dieser Arbeit sollte die Typ I und Typ II Interferon Induzierbarkeit vergleichend untersucht werden. Dabei sollte der Fokus auf folgenden Fragestellungen liegen:

- Untersuchung der Expression von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme auf Transkriptionsebene und auf Translationsebene
- Analyse des Einflusses der Enzyme auf die ISGylierung nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation
- Untersuchung möglicher weiterer an der ISGylierung beteiligter Enzyme

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Bemerkung
MG132	VWR
NEM (N-Ethylmaleimid)	Sigma-Aldrich
Complete (ProteaseinhibitorMix Complete™)	Roche
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin)	Sigma-Aldrich
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth
Coomassie brilliant blue R250	Sigma-Aldrich
PonceauS	Roth
DBC (Deoxy BIGCHAP)	Applchem
NP-40	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Roth
Tween-20	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Applchem
β-Mercaptoethanol	Roth

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zelllinien und Medien

Basal ISCOVE Medium: basal ISCOVE (Biochrom AG) + 10% FCS (hitzeinaktiviert) (Biochrom AG) + 2mM L-Glutamin (PAA) + 100U/ml Penicillin (PAA) + 0,1mg/ml Streptomycin (PAA)

RPMI 1640 Medium: RPMI 1640 (Biochrom AG) + 10% FCS + 2mM L-Glutamin + 100U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin

DMEM Medium: DMEM (Biochrom AG) + 10% FCS + 2mM L-Glutamin + 100U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin

Tabelle 1: verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Kultur	Medium	Bemerkung
HeLa	humanes Zervixepithelkarzinom	adhärent	Basal ISCOVE	ATCC CCL-2

Bezeichnung	Zelltyp	Kultur	Medium	Bemerkung
HEK293	humane Embryonale Nierenzellen	adhärent	DMEM	ATCC CRL-1573
EBV-B	Epstein-Barr Virus transformierte humane B-Lymphozyten	Suspension	RPMI	
KG-1	humane akute myeloische Leukämie Zellen aus Knochenmark	Suspension	RPMI	ATCC CCL-246
JOSK-M	humane myeloische Leukämie Zellen aus peripherem Blut	Suspension	RPMI	DSMZ ACC 30

2.2.2 Zellkultivierung

1x PBS: 1,37mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, pH 7,2, autoklaviert

Die in Tabelle 1 aufgeführten humanen Zelllinien wurden in sterilen Zellkulturschalen in ihrem jeweiligen Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Suspensionszellen sind bei einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml für 5min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert und in frischem Medium in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml ausgesät worden. Von 90% konfluenten adhären Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen sind einmal mit sterilem PBS gewaschen worden. Zum Ablösen der Zellen wurden diese für 1min mit 1ml Trypsin-EDTA versetzt. Zur Inaktivierung des Trypsins ist die Zellsuspension in 9mL des jeweiligen Zellmediums überführt worden. Die Zellen wurden dann für 5min bei 4°C und 1000 rpm pelletiert und in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml ausgesät.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen

Einfriermedium: jeweiliges Medium + 20% FCS + 10% DMSO (Roth)

Zur Langzeitlagerung wurden 1×10^6 Zellen in 1ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und in einer vorgekühlten Isopropanol-Kryobox bei -80°C über Nacht eingefroren. Dies bewirkte eine gleichmäßige Abkühlung von 1°C je min. Am nächsten Tag konnten die Zellen dann in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

So eingelagerte Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und in 10ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Nach dem Pelletieren sind die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in sterile Kulturschalen überführt worden.

2.2.4 Interferonstimulation

Zur Stimulation von Zellen wurden diese mit 10ng/ml humanem IFN- α , 10ng/ml humanem IFN- β (Miltenyi Biotec) oder 100U/ml humanem IFN- γ (Roche) behandelt. Die jeweiligen Inkubationszeiten sind experimentabhängig angegeben.

2.2.5 Transfektion von Plasmid-DNA

Zur transienten Transfektion von Plasmid-DNA (Tabelle 2) in HeLa Zellen wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurde jedoch, abweichend zum Herstellerprotokoll, mit dem Verhältnis 1 μ g DNA zu 1 μ l Lipofectamine2000 gearbeitet. 6h nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt und die Zellen sind je nach Versuchablauf weiterkultiviert worden.

Tabelle 2: verwendete DNA-Konstrukte

AS – Aminosäure, d.A. – innerhalb dieser Arbeit generiert

Bezeichnung	Insert	Schnittstelle	Vektor	Bemerkung
pcDNA3.1/Zeo			pcDNA3.1/Zeo(+)	Invitrogen
pcDNA3.1-HA-UBE2L6	UBE2L6, N-term. HA	BamHI/ EcoRI	pcDNA3.1/Zeo(+)	d.A.
pcDNA3.1-Herc5	Herc5	XhoI	pcDNA3.1-FLAG-C	(Hochrainer et al 2005)
pARIH1	HHARI, N-term. FLAG	HindIII/ NotI	pFLAG-CMV2	Addgene
pARIH1mut	HHARI delta C, N-term. FLAG	HindIII/ SaII	pFLAG-CMV2	Addgene, AS 1-185
pUBE3A	E6-AP, N-term. HA	BamHI/ HindIII	pCMV4	Addgene
pUBE3Amut	E6-AP C833A, N-term. HA	BamHI/ HindIII	pCMV4	Addgene

2.2.6 Transfektion von siRNA

Zur transienten Inhibition der Expression von Proteinen wurden spezifische siRNAs (Tabelle 3) mit Hilfe des Transfektionsreagenzes X-tremeGENE (Roche) nach Herstellerangaben in HeLa Zellen transfiziert. Dafür wurden die siRNAs und das Transfektionsreagenz zusammen in dem Transfektionsreagenzmedium OptiMEM (Gibco) verdünnt und schrittweise auf die HeLa Zellen gegeben. Alle verwendeten siRNAs sind in der Endkonzentration von 25nM eingesetzt worden. Ein Mediumwechsel wurde 6h nach der Transfektion vorgenommen und anschließend sind die Zellen je nach Versuchablauf weiterkultiviert worden.

Tabelle 3: verwendete siRNAs

(1) ON-TARGETplus SMART pool siRNAs, (2) siGENOME SMARTpool siRNAs der Firma Dharmacon. Die siRNA pools bestehen jeweils aus 4 verschiedenen Oligonukleotiden die an unterschiedlichen Sequenzen der Ziel-mRNA binden.

siRNA	Dharmacon Katalog Nummer	Bemerkung
Kontroll siRNA	D-001810-01-20	Dharmacon
ISG15	L-004235-00-0005	Dharmacon, (1)
UBE2L6	L-008569-00-0005	Dharmacon, (1)
Herc5	L-005174-00-0005	Dharmacon, (1)
TRIM25	L-006585-00-0005	Dharmacon, (1)
PJA2	M-006916-00	Dharmacon, (2)
MAP3K1	M-003575-02	Dharmacon, (2)
TOPORS	M-020048-00	Dharmacon, (2)
RNF19	M-006965-00	Dharmacon, (2)
PARC	M-014128-01	Dharmacon, (2)
UBE2E1	M-008850-01	Dharmacon, (2)
UBE3A	M-005137-00	Dharmacon, (2)
RNF122	M-007068-00	Dharmacon, (2)
RNF25	M-007047-00	Dharmacon, (2)
RNF150	M-010713-01	Dharmacon, (2)
ARIH1	M-019984-00	Dharmacon, (2)
IBRDC2	M-025119-01	Dharmacon, (2)
TRIM56	M-007079-00	Dharmacon, (2)
TRIM5	M-007100-00	Dharmacon, (2)

siRNA	Dharmacon Katalog Nummer	Bemerkung
C20ORF18	M-006932-02	Dharmacon, (2)
IBRDC3	M-010203-00	Dharmacon, (2)
PCGF5	M-007089-01	Dharmacon, (2)
TRIM38	M-006929-01	Dharmacon, (2)
HERC4	M-021426-01	Dharmacon, (2)
TRIM6-TRIM34	M-032369-00	Dharmacon, (2)
TRIM69	M-007137-01	Dharmacon, (2)
SSA1	M-006563-02	Dharmacon, (2)
DTX3L	M-007143-01	Dharmacon, (2)
TRIM22	M-006927-03	Dharmacon, (2)
RNF31	M-021419-01	Dharmacon, (2)

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Antikörpergenerierung

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das Protein ISG15 generiert. Das rekombinant aufgereinigte humane ISG15 Protein (Biomol) ist als Antigen zur Immunisierung von Kaninchen durch die Firma Pineda-Antikörper-Service eingesetzt worden. Die Immunreaktivität der Antikörperseren wurde 30, 60 und 90 Tage nach der Immunisierung getestet. Zur Untersuchung der Kreuzreaktivität des Antikörperserums ist rekombinant aufgereinigtes His-ISG15 (Biomol), sowie rekombinant aufgereinigtes diUbiquitin und tetraUbiquitin genutzt worden, welches von Anne Wiemhoefer stammt. Im weiteren Verlauf wurde das Antikörperserum zur spezifischen Detektion von ISG15 im Western Blot verwendet.

2.3.2 Zellaufschluss

Lysepuffer: 20mM Tris-HCl pH7,5, 10mM EDTA, 100mM NaCl, 1% NP-40, 10mM NEM, 10µM MG132, 1xComplete

Die Ernte von Suspensions- und adhärenenten Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben durch Pelletieren der Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und in

Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte für 30min auf Eis. Durch Zentrifugation für 10min bei 14000rpm und 4°C wurde das Ganzzelllysate (Überstand) von den Zelltrümmern (Pellet) gewonnen und für weitere Experimente genutzt.

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA protein assay kit (Pierce) genutzt. Sowohl die Proteinbestimmung des Ganzzelllysates, als auch die BSA-Eichreihe sind in Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers durchgeführt worden.

2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamidlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (AppliChem)

Sammelgel: 4% Acrylamid, 125mM Tris-HCl pH6,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,03% TEMED

Trenngel: 12,5% Acrylamid, 375mM Tris-HCl pH8,8, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,03% TEMED

Laufpuffer: 25mM Tris-HCl pH8,5, 200mM Glycin, 0,1% SDS

4x SDS-Probenpuffer: 240mM Tris-HCl pH6,8, 40% Glycerin, 12,5% SDS, 15% β -Mercaptoethanol

Die denaturierende Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE erfolgte nach dem diskontinuierlichen System von Laemmli (Laemmli 1970). Dafür wurden 20 bis 30 μ g Ganzzelllysate mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5min bei 95°C gekocht und anschließend auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Der Proteinmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) diente als Molekulargewichtsstandard. Die Elektrophorese erfolgte bis zur gewünschten Auftrennung bei 100V.

2.3.5 Coomassiefärbung

Coomassie-Lösung: 10% Essigsäure, 30% Methanol, 0,1% Coomassie brilliant blue R250

Entfärber: 10% Essigsäure, 30% Methanol

SDS-Polyacrylamidgele wurden in Coomassie-Lösung für 1min in einer Mikrowelle erhitzt und anschließend für 30min geschwenkt. Das so vollständig gefärbte Gel ist anschließend in Entfärber überführt worden und wurde solange geschwenkt, bis das Gel entfärbt und die Proteinbanden gut sichtbar waren.

2.3.6 Western Blot und Immundetektion

Naß-Blot-Puffer: 25mM Tris, 200mM Glycin, 10% Methanol

PonceauS-Lösung: 1% PonceauS, 5% Essigsäure

PBS-T: 1x PBS, 0,4% Tween-20

Blockierungslösung: 1x PBS, 0,4% Tween-20, 10% Roti-Block (Roth)

Mit Hilfe des Naß-Blot-Verfahrens wurden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Millipore) durch Elektroblothing übertragen. Dabei wurde bei einer konstanten Stromstärke von 400mA für 90min gearbeitet.

Die Überprüfung des Proteintransfers ist durch das Anfärben der Membran mit PonceauS-Lösung erfolgt. Zum Entfärben der Membran wurde diese in Wasser geschwenkt. Es folgte eine Inkubation der Membran mit Blockierungslösung für 1h bei RT. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen primären Antikörper (Tabelle 4), der zuvor in Blockierungslösung verdünnt worden ist, geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für 10min mit PBS-T gewaschen und dann für 1h mit dem zuvor in Blockierungslösung verdünnten sekundären Antikörper (Tabelle 4) inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen für 10min mit PBS-T erfolgte die peroxidasevermittelte Chemilumineszenzreaktion mit dem ECL Plus Western Blotting Reagents (GE Healthcare) nach Herstellerangaben, sowie die Detektion des Signals durch Belichtung von X-OMAT UV Filmen (Kodak). Zur densitometrischen Auswertung der Signale ist das Programm ImageJ (Tabelle 9) verwendet worden.

Tabelle 4: verwendete Antikörper

p – primäre Antikörper, s – sekundäre Antikörper

Antikörper	p/s	Spezies	Verdünnung	Bemerkung
anti-βActin	p	Maus	1:10000	Santa Cruz Biotechnology
anti-GAPDH	p	Kaninchen	1:10000	Santa Cruz Biotechnology
anti-Ubiquitin	p	Kaninchen	1:2500	Dako
anti-ISG15	p	Kaninchen	1:10000	Pineda-Antikörper-Service
anti-UBE1L	p	Kaninchen	1:1000	Acris
anti-UBE2L6	p	Maus	1:2000	Abnova
anti-Herc5	p	Maus	1:4000	Abnova

Antikörper	p/s	Spezies	Verdünnung	Bemerkung
anti-TRIM25	p	Maus	1:2000	BD Biosciences
anti-UBE3A	p	Kaninchen	1:1000	MBL
anti-ARIH1	p	Kaninchen	1:1000	AVIVA Systems Biology
anti-LMP7	p	Kaninchen	1:10000	AG Klotzel
Anti-TAP1	p	Kaninchen	1:1000	Rockland inc.
anti-FLAG	p	Maus	1:1000	Sigma
anti-Kaninchen-HRP	s	Ziege	1:5000	Dianova
anti-Maus-HRP	s	Schaf	1:5000	Seramun

2.3.7 Immunpräzipitation

HEPES-Lysepuffer: 33mM HEPES pH7,3, 150mM Kaliumacetat, 4mM Magnesiumacetat, 10% Glycerin, 1% DBC, 10mM NEM, 10µM MG132, 1xComplete

HEPES-Waschpuffer: 33mM HEPES pH7,3, 150mM Kaliumacetat, 4mM Magnesiumacetat, 10% Glycerin, 0,2% DBC

HeLa Zellen wurden mit pcDNA3.1-HA-UBE2L6, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, transfiziert. Nach der Ernte ist das Zellpellet in HEPES-Lysepuffer resuspendiert worden und die Lyse der Zellen erfolgte für 30min auf Eis. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm wurde das Ganzzelllysate von den Zelltrümmern getrennt und es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration (2.3.3). Zur Immunpräzipitation von HA-UBE2L6 wurden 3mg Ganzzelllysate mit 50µl EZview Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma-Aldrich), welches zuvor in HEPES-Lysepuffer equilibriert wurde, für 4h rollend bei 4°C inkubiert. Anschließend ist das Anti-HA Affinity Gel bei 4°C und 2500rpm pelettiert, sowie dreimal mit HEPES-Waschpuffer und einmal mit Wasser gewaschen worden. Zur Elution der Proteine, die an das Anti-HA Affinity Gel gebunden haben, wurde dieses für 10min bei 95°C in 1x SDS-Probenpuffer aufgekocht. Der Überstand wurde anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt (2.3.4).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des RNAeasy Plus Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Durch Messung der Absorption bei 260nm (A_{260nm}) wurde die RNA-Konzentration nach der Formel $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot A_{260nm}$ bestimmt. Die Gesamt-RNA ist bei -80°C gelagert worden.

2.4.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kits (Roche) wurde $1\mu\text{g}$ Gesamt-RNA mit poly-dT Primern nach Vorgabe des Herstellers in cDNA revers transkribiert.

2.4.3 Klonierung von Plasmid-DNA

2.4.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA wurde die Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Für die Amplifikation von DNA für Real-time-Standards sind das FastStart High Fidelity PCR System (Roche), sowie die entsprechenden Real-time Primer (Tabelle 5, Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet worden. Um DNA für Überexpressionkonstrukte zu vervielfältigen, wurden die Pwo SuperYield DNA Polymerase (Roche) und spezifische Primer (Tabelle 6, Biotex) nach den Angaben des Herstellers genutzt. In beiden Fällen wurde das folgende PCR-Programm verwendet, wobei die Annealingtemperatur in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der verwendeten Primer variierte:

3min		95°C	(Denaturierung)
30 Zyklen je	30sec	95°C	
	30sec	55-60°C	(Annealing)
	45sec	72°C	(DNA-Polymerisation)
	7min	72°C	
	∞	4°C	

Tabelle 5: verwendete Real-time-Primer zur Herstellung von Real-time-Standards

Primer	Applied Biosystems Katalog Nummer	Bemerkung
HPRT1	Hs99999909_m1	ergibt ein 100bp Fragment
ISG15	Hs00192713_m1	ergibt ein 100bp Fragment
UBE1L	Hs00163295_m1	ergibt ein 68bp Fragment
UBE2L6	Hs00188450_m1	ergibt ein 86bp Fragment
Herc5	Hs00180943_m1	ergibt ein 76bp Fragment
TRIM25	Hs00231947_m1	ergibt ein 111bp Fragment
USP18	Hs00276441_m1	ergibt ein 102bp Fragment

Tabelle 6: verwendete Primer für Überexpressionskonstrukte

Primer	5'-3'-Sequenz	Bemerkung
UBE2L6-BamHI-HA-F	CTCGGATCCGCCACCATGTACCCATACGAT GTTCCAGATTACGCTCTCGAGATGATGGCG AGCATGCGAGTGGTGAAGGAG	BamHI, Kozak-Sequenz, HA-tag, XhoI, für pcDNA3.1/Zeo(+)
UBE2L6-EcoRI-R	GGCGAATTCTTAGGAGGGCCGGTCCACTCC GAATCGGAG	EcoRI, für pcDNA3.1/Zeo(+)

2.4.3.2 Restriktion von DNA

Zur Herstellung von Überexpressionskonstrukten wurden der Klonierungsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) und das PCR-Produkt mit den gleichen Restriktionsenzymen (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers geschnitten. Die entstandenen geschnittenen Fragmente wurden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt.

2.4.3.3 Agarosegelelektrophorese

1x TAE-Puffer: 40mM Tris, 1mM EDTA, 20mM Essigsäure

6x DNA-Probenpuffer: 50% Glycerin, 50mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau

Gellösung: 1xTAE, 1% Agarose, 0,1µg/ml Ethidiumbromid

DNA-Proben, aus PCR-Ansätzen oder Restriktionsversuchen, wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Der 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) diente als Größenstandard. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Wellenlänge von 312nm auf einem UV-Leuchttisch. Je nach Fragestellung

wurde die so detektierte DNA zur Dokumentation fotografiert oder aus dem Gel ausgeschnitten und weiter aufgearbeitet.

2.4.3.4 Aufreinigung von DNA und PCR-Produkten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN).

2.4.3.5 Ligation

Die Ligation von aufgereinigten geschnittenen PCR-Produkten und Klonierungsvektoren wurden mittels der T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) nach Vorschrift des Herstellers vorgenommen. Bei der Ligation ist das PCR-Produkt im Überschuss eingesetzt worden, dabei wurde ein 5:1 Verhältnis von PCR-Produkt zu Klonierungsvektor gewählt.

2.4.3.6 Transformation von Plasmid-DNA

SOC-Medium: 2% Bactotrypton, 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt, 20mM Glukose, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 10mM NaCl

LB_{amp}-Medium: 1% Bactotrypton, 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt, 171mM NaCl, 100µg/ml Ampicillin

LB_{amp}-Platten: 1% Bactotrypton, 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt, 171mM NaCl, 1,5% Bactoagar, 100µg/ml Ampicillin

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden DH5α *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Diese wurden dann entweder mit dem Ligationsansatz oder mit 1µg Plasmid-DNA für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend ist für 45sec ein Hitzschock bei 42°C vorgenommen worden und es folgte eine 2minütige Inkubation auf Eis. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 250µl SOC-Medium für 45min bei 37°C geschüttelt. Die so transformierten *E.coli*-Zellen wurden entweder auf LB_{amp}-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert oder sie wurden in 200ml LB_{amp}-Medium überführt und schüttelnd ebenfalls bei 37°C inkubiert.

2.4.3.7 TOPO-TA-Cloning®

Zur Herstellung von Real-time-Standards wurden das TOPO-TA-Cloning® Kit (Invitrogen) genutzt. Dafür sind die generierten PCR-Produkte in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert und in chemisch kompetente TOP10-Zellen durch Hitzschock transformiert worden. Die Aufzucht der so transformierten Zellen erfolgte schüttelnd bei 37°C in LB_{amp}-Medium. Bei der Durchführung wurde sich nach dem Protokoll des Herstellers gerichtet.

2.4.3.8 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Mini Kit oder das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben genutzt.

2.4.4 Real-time PCR

Für die Real-time PCR wurde die unter 2.4.2 generierte cDNA, sowie Real-time Primer (Tabelle 7, Applied Biosystems) und der TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) genutzt. Es ist mit einem Rotor Gene 3000 Cyclor (Corbett Research) nach folgendem Programm gearbeitet worden:

10min		95°C
40 Zyklen je	15sec	95°C
	60sec	60°C

Zur Ermittlung der relativen Expressionslevel der zu untersuchenden Gene wurde zum einen die $\Delta\Delta CT$ Methode angewandt oder es wurde eine relative Quantifizierung mit Hilfe einer Standardkurve durchgeführt. In beiden Fällen diente die Expression des HPRT1 Gens zur Normalisierung der Proben.

Tabelle 7: verwendete Real-time-Primer
5-FAM – 5-Carboxyfluorescein

Primer	Applied Biosystems Katalog Nummer	Bemerkung
HPRT1	Hs99999909_m1	Farbstoff: 5-FAM
ISG15	Hs00192713_m1	Farbstoff: 5-FAM
UBE1L	Hs00163295_m1	Farbstoff: 5-FAM

Primer	Applied Biosystems Katalog Nummer	Bemerkung
UBE2L6	Hs00188450_m1	Farbstoff: 5-FAM
Herc5	Hs00180943_m1	Farbstoff: 5-FAM
TRIM25	Hs00231947_m1	Farbstoff: 5-FAM
USP18	Hs00276441_m1	Farbstoff: 5-FAM
IRF7	Hs00185375_m1	Farbstoff: 5-FAM

Zur Herstellung von Real-time Standards wurden die Inserts mit den entsprechenden Real-time Primern mittels PCR (2.4.3.1) amplifiziert und anschließend durch TOPO-TA-Cloning® in den pCR2.1-TOPO-Vektor ligiert. Zur Generierung einer Standardkurve sind die Vektoren, wie in Tabelle 8 aufgelistet, mit Hilfe des Restriktionsenzym *HindIII* (New England Biolabs) linearisiert worden. Anschließend wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe von 5×10^5 bis 977 Kopien/ μ l hergestellt.

Tabelle 8: verwendete Real-time Standards

lin. RTS – linearisierter Real-time Standard, d.A. – innerhalb dieser Arbeit generiert, F.E. – von Frédéric Ebstein generiert

Bezeichnung	Insert	Schnittstelle	Vektor	Bemerkung
pCR2.1-TOPO			pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pCR2.1-ISG15	ISG15	<i>HindIII</i>	pCR2.1-TOPO	lin. RTS, d.A.
pCR2.1-UBE1L	UBE1L	<i>HindIII</i>	pCR2.1-TOPO	lin. RTS, F.E.
pCR2.1-UBE2L6	UBE2L6	<i>HindIII</i>	pCR2.1-TOPO	lin. RTS, F.E.
pCR2.1-Herc5	Herc5	<i>HindIII</i>	pCR2.1-TOPO	lin. RTS, F.E.
pCR2.1-TRIM25	TRIM25	<i>HindIII</i>	pCR2.1-TOPO	lin. RTS, d.A.
pCR2.1-USP18	USP18	<i>HindIII</i>	pCR2.1-TOPO	lin. RTS, F.E.

2.4.5 Affimetrix Microarray

Die Genexpressionsanalyse von isolierter Gesamt-RNA (2.4.1), sowie die Datenauswertung erfolgte durch die Firma Signature Diagnostics (Potsdam Deutschland). Es wurde der Human U133 2.0 Plus-Array (Affimetrix) genutzt.

2.5 Software und Datenbanken

Im Rahmen dieser Arbeit sind unterschiedliche Programme und Datenbanken genutzt worden.

Tabelle 9: verwendete Datenbanken und Programme

URL	Datenbanken und Programme
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Datenbank, PubMed
http://www.ensembl.org/index.html	Datenbank, Ensemble
http://expasy.org/	Datenbank, Expasy
http://www.addgene.org/pgvec1	Datenbank, Addgene
http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	NEBcutter V2.0
http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html	ClustalW
http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	Oligonucleotide Properties Calculator
http://rsbweb.nih.gov/ij/	ImageJ, densitometrische Auswertung
	Rotor Gene Monitor Software (Version 4.6)

3 Ergebnisse

3.1 Spezifität des generierten ISG15-Antikörpers

Das ISG15 Protein besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Ubiquitin-ähnlichen Domäne, die beide in ihrer Aminosäuresequenz eine hohe Identität zu Ubiquitin aufweisen. Innerhalb des Entdeckungs- und Charakterisierungsprozesses hat sich gezeigt, dass ein gegen Ubiquitin gerichteter Antikörper im Western Blot auch ISG15 detektieren kann, was dazu geführt hat, dass ISG15 unter dem Namen *Ubiquitin Cross-Reactive Protein* (UCRP) bekannt wurde (Haas et al 1987).

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein polyklonaler Antikörper, der gegen das ISG15 Protein gerichtet ist, generiert und dessen Kreuzreaktivität und Spezifität analysiert. Für die Untersuchung der Kreuzreaktivität wurden rekombinant aufgereinigtes His-ISG15, diUbiquitin und tetraUbiquitin, sowie Ganzzelllysate von IFN- β stimulierten HeLa Zellen im Western Blot vergleichend mit dem ISG15-Antikörper und mit einem Ubiquitin-Antikörper detektiert. In Abbildung 7A zeigt sich, dass der ISG15-Antikörper His-ISG15, sowie endogenes ISG15 und ISG15-Konjugate, jedoch nicht diUbiquitin und tetraUbiquitin erkennt. Der Ubiquitin-Antikörper in Abbildung 7B detektiert neben diUbiquitin und tetraUbiquitin auch His-ISG15 und endogenes ISG15.

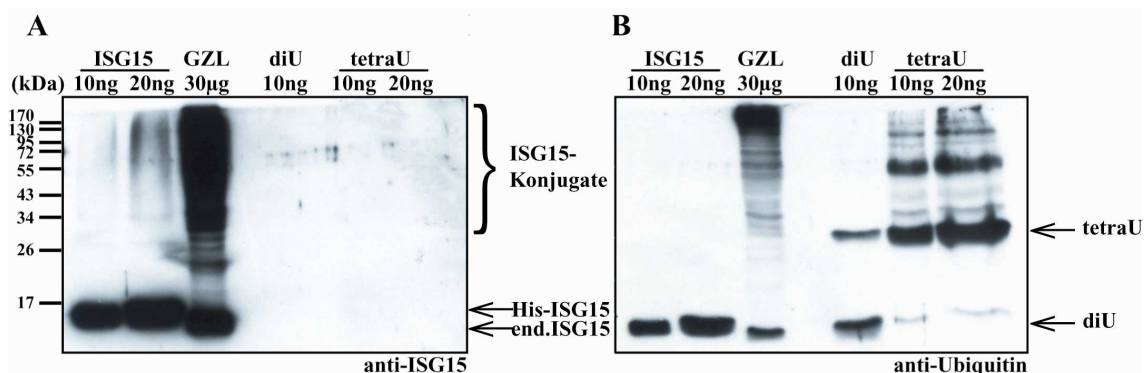


Abbildung 7: Untersuchung der Kreuzreaktivität des generierten ISG15-Antikörpers

Es wurden jeweils 10ng und 20ng des rekombinant aufgereinigten His-ISG15 (ISG15), 10ng rekombinant aufgereinigtes diUbiquitin (diU), 10ng und 20ng rekombinant aufgereinigtes tetraUbiquitin (tetraU), sowie 30μg Ganzzelllysate (GZL) von HeLa Zellen, die für 24h mit IFN- β behandelt wurden, über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert **A)** Immundetektion mit ISG15-Antikörper **B)** Immundetektion mit Ubiquitin-Antikörper, Pfeile und Klammern kennzeichnen die aufgetrennten Proteine bzw. Konjugate: end.ISG15 (endogenes ISG15)

Die Spezifität des ISG15-Antikörpers wurde durch die transiente Inhibition der Expression von ISG15 mittels spezifischer siRNA untersucht. Dafür sind HeLa Zellen mit siRNA gegen ISG15

und Kontroll siRNA transfiziert und anschließend für 24h bzw. 48h mit IFN- β stimuliert worden. Da ISG15 und die Formation von ISG15-Konjugaten durch Typ I Interferon Stimulation induziert werden, sollte mit Hilfe des ISG15-Antikörpers, in mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen, deren Akkumulation detektiert werden können. In mit ISG15 siRNA transfizierten Zellen dürfte dies jedoch nicht zu beobachten sein. Abbildung 8 zeigt die Detektion der Akkumulation von endogenem ISG15 und ISG15-Konjugaten im Ganzzelllysate der mit Kontroll siRNA behandelten Zellen. Dies ist in mit ISG15 siRNA transfizierten Zellen nicht zu beobachten, was für eine hohe Spezifität des ISG15-Antikörpers spricht.

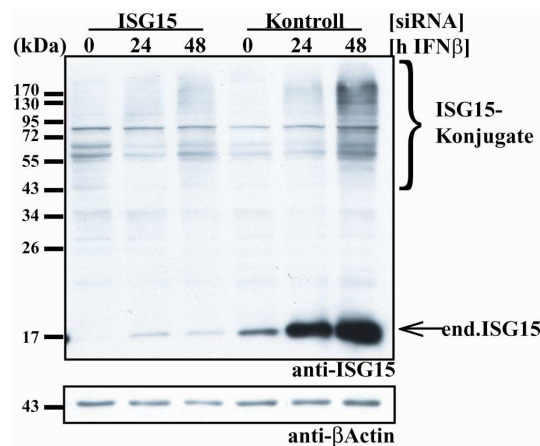


Abbildung 8: Untersuchung der Spezifität des ISG15-Antikörpers

HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen ISG15 und Kontroll siRNA in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion sind die HeLa Zellen für weitere 24h bzw. 48h mit 10ng/ml IFN- β behandelt worden. Es wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt und je 25 μ g GZL wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Western Blot erfolgte die Immundetektion mit ISG15-Antikörper. Als Ladekontrolle diente β Actin.

3.2 Zelllinienvergleich

In dieser Arbeit sollte die Regulation von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation vergleichend untersucht werden. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass viele Zelllinien mit der Expression von ISG15 nach Typ I jedoch nicht nach Typ II Interferon Stimulation reagieren. Dies wurde in Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit gebracht, eine antivirale Antwort auf den jeweiligen Stimulus auszulösen (Haas et al 1987). Um eine Zelllinie zu finden, die nach beiden Stimuli mit der Expression von ISG15 reagiert, wurden unterschiedliche Zelllinien untersucht. Die in Abbildung 9 aufgeführten EBV-B, KG-1, JOSK-M und HEK293 Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit IFN- β und IFN- γ stimuliert. Das Ganzzelllysate ist anschließend im Western Blot mit dem ISG15-Antikörper untersucht worden. In allen vier Zelllinien ist eine starke Akkumulation von ISG15

und ISG15-Konjugaten nach IFN- β , jedoch nicht nach IFN- γ Stimulation zu beobachten. Eine Kontrolle der generellen Sensitivität der Zellen auf IFN- β und IFN- γ wurde in JOSK-M und HEK293 Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Interferon Typ I und Typ II induzierbaren Proteine *transporter associated with antigen processing* (TAP1) und *low molecular weight protein 7* (LMP7) untersucht. In JOSK-M Zellen ist die Hochregulation von TAP1 nach beiden Stimuli detektierbar und HEK293 Zellen zeigen eine Akkumulation von LMP7 sowohl nach IFN- β als auch nach IFN- γ Stimulation, was für eine generelle Sensitivität der Zellen gegenüber beiden Interferonen spricht.

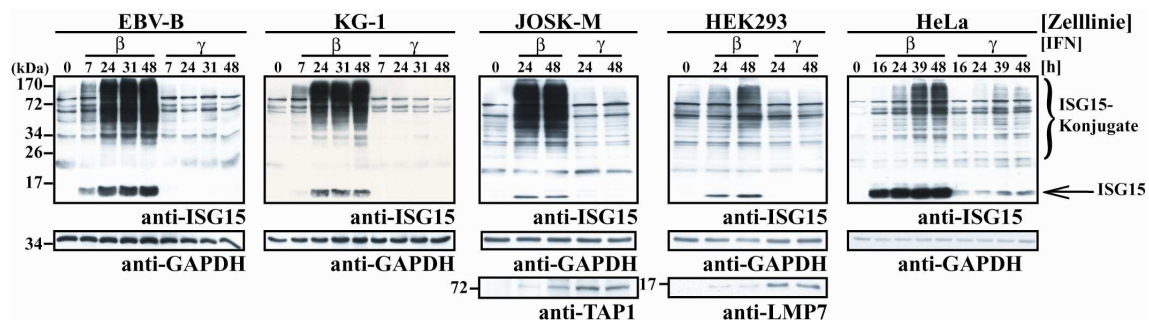


Abbildung 9: Detektion von ISG15 in unterschiedlichen Zelllinien nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation

EBV-B, KG-1, JOSK-M, HEK293 und HeLa Zellen wurden mit 10ng/ml IFN- β oder mit 100U/ml IFN- γ für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Es wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt und je 25 μ g GZL sind über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt worden. Nach dem Western Blot folgte die Immundetektion mit ISG15-Antikörper und GAPDH-Antikörper als Ladekontrolle. Für JOSK-M Zellen erfolgte zusätzlich die Immundetektion mit TAP1-Antikörper und für HEK293 Zellen mit LMP7-Antikörper.

HeLa Zellen wurden ebenfalls mit IFN- β und IFN- γ für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Die Ganzzelllysate sind nach dem Western Blot mit ISG15-Antikörper untersucht worden. Es zeigte sich, dass nicht nur nach IFN- β , sondern auch nach IFN- γ Stimulation ISG15, sowie ISG15-Konjugate detektiert werden konnten. Anhand dieses Resultats wurden für alle weiteren Experimente HeLa Zellen genutzt.

3.3 Regulation von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach Interferon Stimulation

3.3.1 Kinetische Analyse von ISG15 und ISG15-Konjugaten auf Translationsebene

Der zeitliche Verlauf der Expression von ISG15 und die Bildung der ISG15-Konjugate wurde in HeLa Zellen nach Interferon Stimulation genauer untersucht. Dafür wurde eine kinetische Analyse bis 48h für die Stimulation der Zellen mit IFN- α , IFN- β und IFN- γ durchgeführt (Abbildung 10). Es wird deutlich, dass durch Typ I Interferon Stimulation, IFN- α und IFN- β , die Expression von ISG15 sehr stark induziert wird. Es ist eine kontinuierliche Akkumulation von ISG15 in den ersten 25h zu beobachten, wobei zu späteren Zeitpunkten die Menge an exprimiertem ISG15 konstant zu bleiben scheint. Die Expression von ISG15 nach Typ II Interferon Stimulation, IFN- γ , nimmt ebenfalls in den ersten 25h kontinuierlich zu, jedoch in einem weitaus geringerem Maß als nach IFN- α und IFN- β Stimulation.

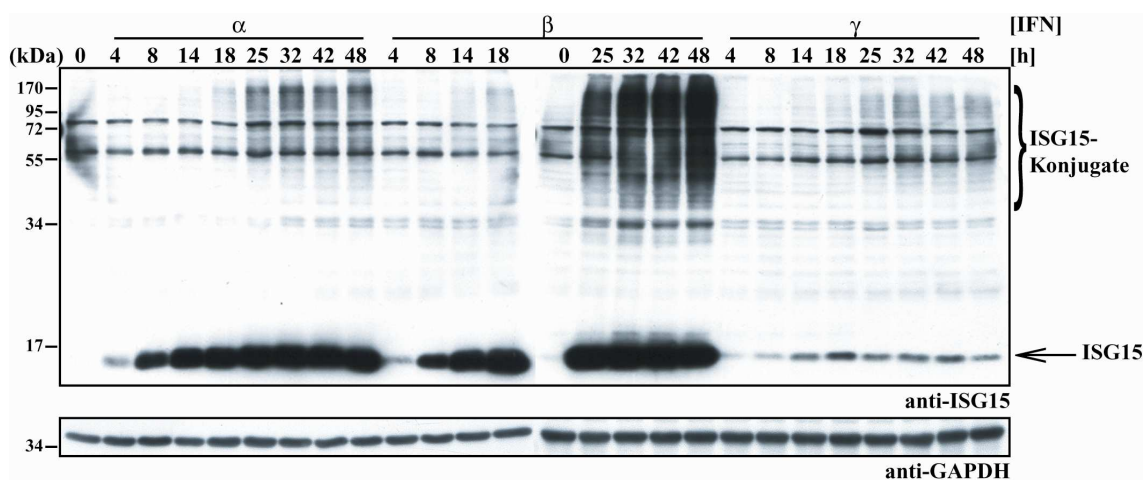


Abbildung 10: Detektion von ISG15 in HeLa Zellen nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation

HeLa Zellen wurden mit 10ng/ml IFN- α , 10ng/ml IFN- β oder 100U/ml IFN- γ für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Es wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt und je 25 μ g GZL wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit ISG15-Antikörper und GAPDH-Antikörper als Ladekontrolle.

Nach ca. 18h bis 25h ist nach allen drei Stimuli die Formation eines hochmolekularen „Schmiers“, der die ISG15-Konjugate darstellt, zu beobachten. Die Menge der gebildeten ISG15-Konjugate unterscheidet sich jedoch zwischen den einzelnen Interferonen. Während nach IFN- β Stimulation eine relativ große Menge an ISG15-Konjugaten gebildet wurde, ist diese nach IFN- α und IFN- γ wesentlich geringer. Interessanterweise ist die Menge der

gebildeten ISG15-Konjugate zwischen IFN- α und IFN- γ vergleichbar, wohingegen sich die Expression des freien ISG15 nach beiden Stimuli mengenmäßig grundlegend voneinander unterscheidet. Dabei wird nach IFN- γ Stimulation deutlich weniger freies ISG15 exprimiert als nach IFN- α Stimulation. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch die Stimulation mit den drei Interferonen die Enzyme, die für die ISGylierung von Proteinen sorgen, unterschiedlich induziert werden.

3.3.2 Kinetische Analyse der an der ISGylierung beteiligten Enzyme auf Translationsebene

Um zu überprüfen ob und wie sich die Expression der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach IFN- α , IFN- β und IFN- γ Stimulation auf Proteinebene verändert, wurden die Ganzzelllysate aus dem vorangegangenen Experiment genutzt und nach dem Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen UBE1L, UBE2L6, Herc5 und TRIM25 immundetektiert.

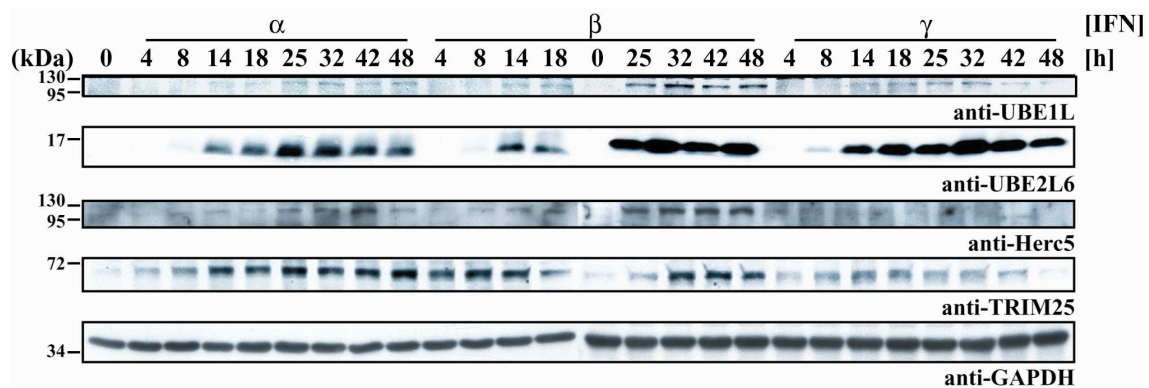


Abbildung 11: Detektion der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation

HeLa Zellen sind mit 10ng/ml IFN- α , 10ng/ml IFN- β oder 100U/ml IFN- γ für die angegebenen Zeiträume inkubiert worden. Je 25 μ g Ganzzelllysat wurden über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran im Western Blot übertragen. Die Proteine UBE1L, UBE2L6, Herc5 und TRIM25 sind mit spezifischen Antikörpern detektiert worden. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass UBE1L, UBE2L6, sowie TRIM25 nach allen drei Stimuli exprimiert werden. Herc5 hingegen ist nur nach IFN- α und IFN- β , also Typ I Interferon Stimulation detektierbar. Es ist weiterhin zu erkennen, dass in IFN- β stimulierten Zellen UBE1L, UBE2L6 und Herc5 stärker exprimiert werden als in IFN- α stimulierten Zellen. Die Expression von TRIM25 nach IFN- α und IFN- β ist vergleichbar, jedoch deutlich geringer nach IFN- γ Stimulation. IFN- α und IFN- γ induzieren die Expression von UBE1L in ähnlichem Maß.

Die Expression von UBE2L6 ist nach IFN- β und IFN- γ Stimulation vergleichbar, nach IFN- α Stimulation jedoch geringer.

3.3.3 Analyse der Expression von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme auf Transkriptionsebene

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den beiden vorangegangenen Experimenten wurde die Expression von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach IFN- α , IFN- β und IFN- γ Stimulation auf mRNA-Ebene mittels Real-time PCR untersucht (Abbildung 12).

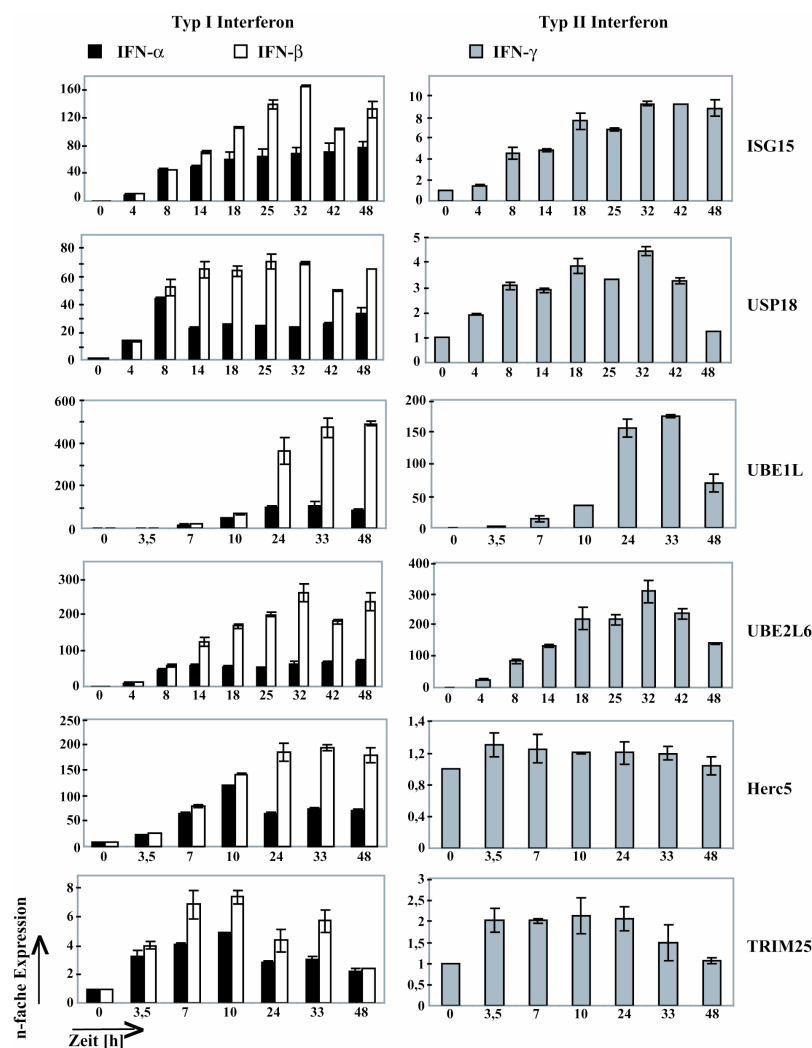


Abbildung 12: Expressionsanalyse von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme
HeLa Zellen wurden für unterschiedliche Zeiträume mit 10ng/ml IFN- α , 10ng/ml IFN- β oder 100U/ml IFN- γ inkubiert. Die Expression von ISG15, USP18, UBE1L, UBE2L6, Herc5 und TRIM25 ist mittels Real-time PCR analysiert worden. Die graphisch aufgeführten Werte wurden gegen HPRT normalisiert und sind Mittelwerte, sowie Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Experimenten.

ISG15 wird durch alle drei Stimuli induziert und erreicht sein maximales Expressionslevel nach ca. 25h bis 32h. Dabei ist zu erkennen, dass nach IFN- β Stimulation die Expression von ISG15 ca. 160fach im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht wird. Die Expression nach IFN- α Stimulation ist ca. 80fach und nach IFN- γ Stimulation ca. 10fach erhöht. Es zeigt sich, dass USP18, UBE1L, UBE2L6 und TRIM25 nach IFN- α , IFN- β und IFN- γ Stimulation mit einer ähnlichen Kinetik wie ISG15 exprimiert werden. Dies ist ebenfalls nach Typ I Interferon Stimulation für die Expression von Herc5 erkennbar. Herc5 wird jedoch nicht durch IFN- γ induziert. Weiterhin wird deutlich, dass Typ I Interferone die Expression von USP18 und TRIM25 stärker induzieren als das Typ II Interferon IFN- γ . Im Gegensatz zu einer früheren Veröffentlichung konnte für TRIM25 eine geringe aber signifikante Hochregulation im Vergleich zu unstimulierten HeLa Zellen nach IFN- γ Stimulation nachgewiesen werden (Nakasato et al 2006). Weiterhin zeigt sich, dass IFN- β alle untersuchten Gene stärker induziert als IFN- α . Die Expression von UBE1L nach IFN- α und IFN- γ Stimulation sind vergleichbar, ebenfalls die UBE2L6 Expression nach IFN- β und IFN- γ Stimulation.

Die Untersuchung der Expression von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach IFN- α , IFN- β und IFN- γ Stimulation auf mRNA- und Proteinebene, korrelieren mit der jeweilig detektierten Menge an ISGylierten Proteinen. Die Beteiligung von USP18, UBE1L, UBE2L6, Herc5 und TRIM25 an der Bildung von ISG15-Konjugaten nach Typ I Interferon Induktion wurde vielfach nachgewiesen. Für deren Beteiligung an der ISGylierung nach Typ II Interferon Stimulation liegen jedoch keine Daten vor. Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit werfen deshalb folgende Fragen auf:

1. Ist die nach IFN- γ Stimulation beobachtete ISGylierung das Resultat einer direkten Induktion der beteiligten Komponenten, oder induziert IFN- γ die Expression von Typ I Interferonen, die ihrerseits für die Hochregulation von ISG15 und der an der ISGylierung beteiligten Enzyme sorgen?
2. Welche der bisher identifizierten Enzyme sind an der ISGylierung nach IFN- γ Stimulation beteiligt?

3.4 Spezifität der IFN- γ Induktion

IFN- γ induziert in erster Linie über den Transkriptionsfaktor GAF, der an GAS DNA-Sequenzmotive bindet, die Transkription von IFN- γ stimulierbaren Genen. Des Weiteren ist IFN- γ jedoch in der Lage in geringem Maß über den Transkriptionsfaktor ISGF3, der an das DNA-Sequenzmotiv ISRE bindet, die Transkription von ISGs zu induzieren. Zu den induzierten ISGs gehört auch IRF7, der nach Phosphorylierung homodimerisiert und für die Transkription von IFN- α und IFN- β sorgt (Lew et al 1991, Takaoka & Yanai 2006). Um zu überprüfen, ob die Hochregulation von ISG15, den Enzymen und die beobachtete ISGylierung direkt von IFN- γ induziert wird oder das Resultat einer IRF7 vermittelten IFN- α und IFN- β Transkription ist, wurde die Expression von IRF7 auf mRNA-Ebene mittels Real-time PCR untersucht.

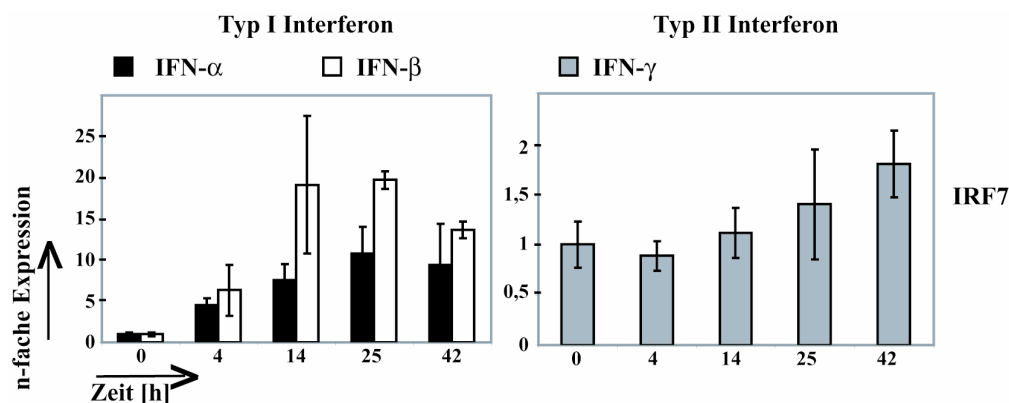


Abbildung 13: Expressionsanalyse des Interferon-regulatorischen Faktors IRF7

Für unterschiedliche Zeiträume wurden HeLa Zellen mit 10ng/ml IFN- α , 10ng/ml IFN- β oder 100U/ml IFN- γ inkubiert. Es ist die Expression von IRF7 mittels Real-time PCR analysiert worden. Alle graphisch aufgeführten Werte wurden gegen HPRT normalisiert und sind Mittelwerte, sowie Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Experimenten.

Die in Abbildung 13 dargestellte Expressionsanalyse von IRF7 zeigt, dass dessen Transkription in HeLa Zellen die mit Typ I Interferonen behandelt wurden, sehr stark induziert wird. Nach 25h führt die Stimulation von Zellen mit IFN- α zu einer max. 10fachen und die Stimulation mit IFN- β zu einer ca. 20fach höheren Expression von IRF7 im Vergleich zu uninduzierten Zellen. Zellen die mit IFN- γ behandelt wurden, zeigen erst nach 42h eine signifikant erhöhte Expression von IRF7, welche 1,8fach über der in uninduzierten Zellen liegt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass IFN- γ die ISGylierung direkt und nicht indirekt über die Induktion von IFN- α und IFN- β vermittelt.

3.5 Enzymbeteiligung an der IFN- γ vermittelten ISGylierung

Das USP18, UBE1L, UBE2L6, Herc5 und TRIM25 an der Bildung von ISG15-Konjugaten nach Typ I Interferon Induktion beteiligt sind, wurde mehrfach gezeigt. Welche dieser Enzyme an der ISGylierung nach IFN- γ Stimulation mitwirken, sollte anhand von siRNA Experimenten untersucht werden. Da USP18 und UBE1L die einzigen ISG15 spezifischen Enzyme sind, wurden in den folgenden Experimenten UBE2L6, Herc5 und TRIM25 untersucht.

3.5.1 Einfluss von UBE2L6

UBE2L6 ist das Haupt-E2-Enzym während der ISGylierung (Takeuchi et al 2005). In Kapitel 3.3.3 konnte gezeigt werden, dass die Expression von UBE2L6 nicht nur durch IFN- β sondern auch durch IFN- γ Stimulation sehr stark und in ähnlichem Maß induziert wird. Um zu untersuchen, ob diese Hochregulation in einem funktionellen Zusammenhang mit der IFN- γ induzierten ISGylierung steht, wurde die Expression von UBE2L6 transient durch die Transfektion von spezifischer siRNA inhibiert. Der siRNA Transfektion schloss sich eine Inkubation mit IFN- β (Abbildung 14A) bzw. IFN- γ (Abbildung 14B) an. Die spezifische und effektive Inhibition der Expression von UBE2L6 ist nach Immundetektion mittels eines Antikörpers gegen UBE2L6 in Abbildung 14A und B dargestellt und konnte auf mRNA-Ebene mittels Real-time PCR in Abbildung 14C und D gezeigt werden. Erwartungsgemäß kommt es nach IFN- β Stimulation zu einer drastisch verringerten Menge an detektierten ISG15-Konjugaten. Dies ist ebenfalls nach Stimulation der Zellen mit IFN- γ zu beobachten. Die Menge an detektiertem freien ISG15, sowie die Expression von TRIM25 bleiben konstant, was darauf hinweist, dass die siRNA spezifisch UBE2L6 reguliert, jedoch keinen Einfluss auf die anderen an der ISGylierung beteiligten Enzyme hat. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass UBE2L6 nicht nur nach IFN- β , sondern auch nach IFN- γ Stimulation einen wesentlichen Einfluss auf die ISGylierung von Proteinen hat.

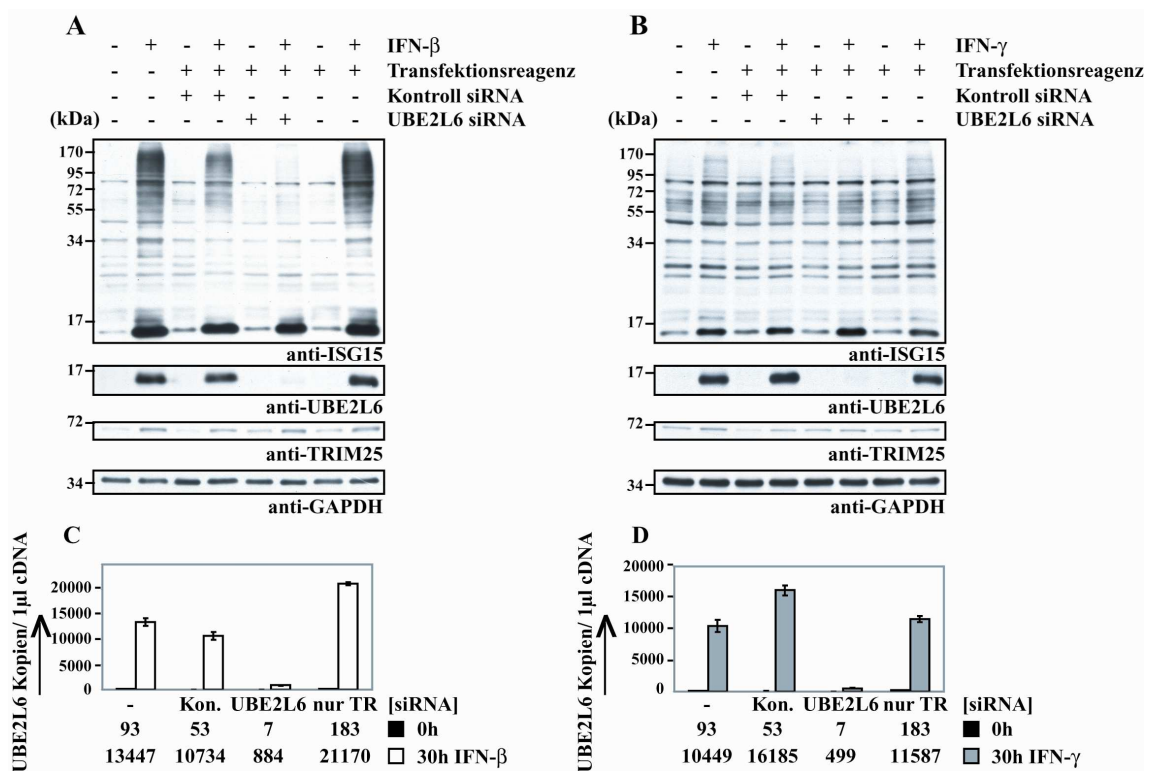


Abbildung 14: Inhibition der Expression von UBE2L6

HeLa Zellen wurden transient mit siRNA gegen UBE2L6 oder Kontroll siRNA in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 30h Inkubation mit 10ng/ml IFN-β (A, C) oder 100U/ml IFN-γ (B, D). Die so behandelten Zellen wurden geteilt. Aus einem Teil wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt und je 25µg GZL sind in einer 12,5%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt worden. Nach dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, UBE2L6, TRIM25 oder GAPDH als Ladekontrolle (A, B). Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die Expression von UBE2L6 mittels Real-time PCR analysiert (C, D). Alle graphisch aufgeführten Werte wurden gegen HPRT normalisiert und sind Mittelwerte, sowie Standardabweichungen aus 2 Experimenten und geben die UBE2L6 Kopien/ 1µl eingesetzter cDNA an. Kon. = Kontroll siRNA, nur TR = nur Transfektionsreagenz

3.5.2 Einfluss von TRIM25

Die Analyse der Expression der an der ISGylierung beteiligten Enzyme hat ergeben, dass TRIM25 die einzige ISG15 E3-Ligase ist, die auf mRNA- und auf Proteinebene nach IFN-γ Stimulation induziert wird (Abbildung 11 und Abbildung 12). Da diese Expression im Verhältnis zur IFN-α und IFN-β induzierten Expression von TRIM25 vergleichsweise schwach ist, sollte TRIM25 durch die Transfektion von spezifischer siRNA transient inhibiert werden.

Damit sollte untersucht werden, ob TRIM25 als E3-Ligase während der IFN- γ induzierten ISGylierung involviert ist.

Abbildung 15 macht deutlich, dass die TRIM25 Expression auf mRNA- und Proteinebene spezifisch inhibiert werden kann und dies keinen Einfluss auf die Expression von UBE2L6 oder freiem ISG15 hat. In Abwesenheit von TRIM25 ist weder nach IFN- β noch nach IFN- γ Stimulation eine Veränderung der Menge der detektierten ISG15-Konjugate feststellbar. Dieses Ergebnis untermauert den Fakt, dass TRIM25 eine eher untergeordnete Rolle während der ISGylierung nach Typ I Interferon Stimulation spielt, da es nur spezielle Proteine zu ISGylieren scheint (Takeuchi et al 2006a). Weiterhin deutet es darauf hin, dass nach IFN- γ Stimulation eine oder mehrere andere E3-Ligasen die Formation von ISG15-Konjugaten übernehmen.

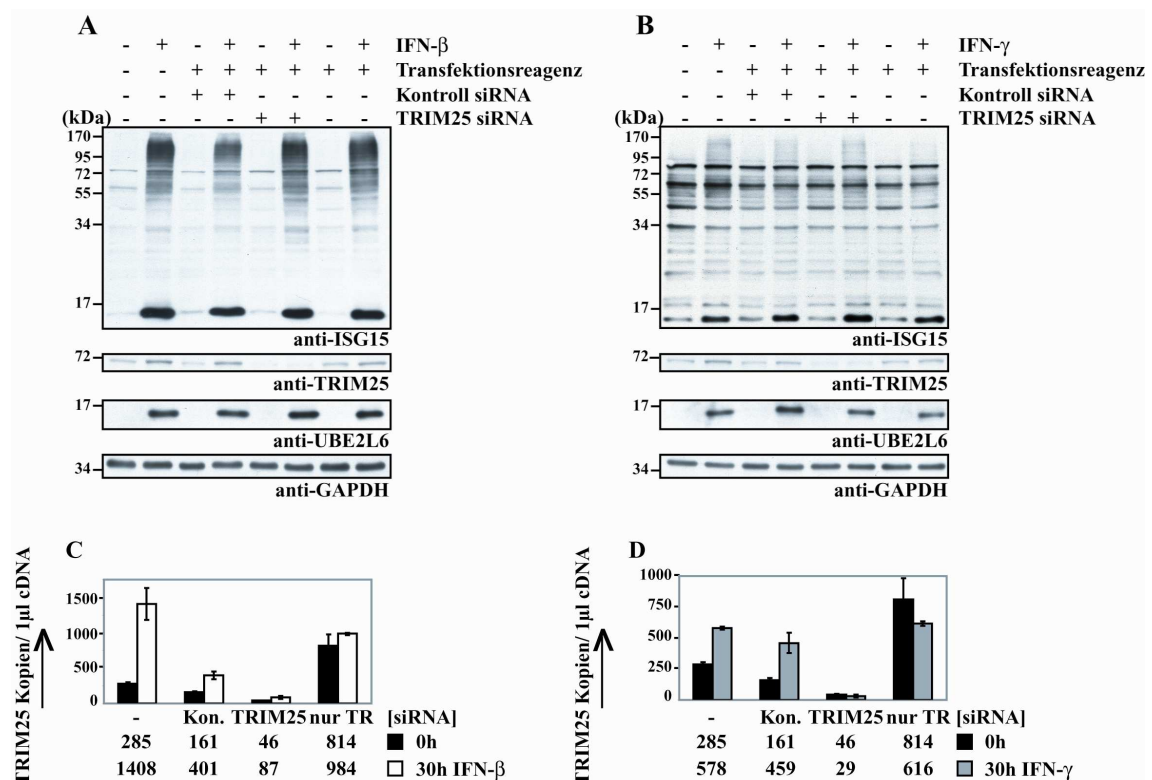


Abbildung 15: Inhibition der Expression von TRIM25

HeLa Zellen wurden transient mit siRNA gegen TRIM25 oder Kontroll siRNA in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 30h Inkubation mit 10ng/ml IFN- β (A, C) oder 100U/ml IFN- γ (B, D). Die so behandelten Zellen wurden geteilt. Aus einem Teil wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt und je 25 μ g GZL sind in einer 12,5%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt worden. Nach dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, TRIM25, UBE2L6 oder GAPDH als Ladekontrolle (A, B). Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die Expression von TRIM25 mittels Real-time PCR analysiert (C, D). Alle graphisch aufgeführten Werte wurden gegen HPRT normalisiert und sind Mittelwerte, sowie Standardabweichungen aus 2 Experimenten und geben die TRIM25 Kopien/ 1 μ l eingesetzter cDNA an. Kon. = Kontroll siRNA, nur TR = nur Transfektionsreagenz

3.5.3 Einfluss von Herc5

Herc5 ist für die Ligation von ISG15 an den größten Teil der zu modifizierenden Proteine nach Typ I Interferon Stimulation verantwortlich (Takeuchi et al 2006a). Abbildung 11 und Abbildung 12 zeigen, dass Herc5 nach IFN- γ Stimulation weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene hochreguliert wird. Um einen möglichen Einfluss von Herc5 auf die IFN- γ vermittelte ISGylierung auszuschließen, wurde es durch die Transfektion von spezifischer siRNA transient inhibiert. Und um die Inhibition der Herc5 Expression zu überprüfen, wurde zum einen die Proteinmenge über einen spezifischen Herc5-Antikörper (Abbildung 16A und B) detektiert und zum anderen wurden die Herc5 Kopien je 1 μ l eingesetzter cDNA mittels Real-time PCR bestimmt (Abbildung 16C und D).

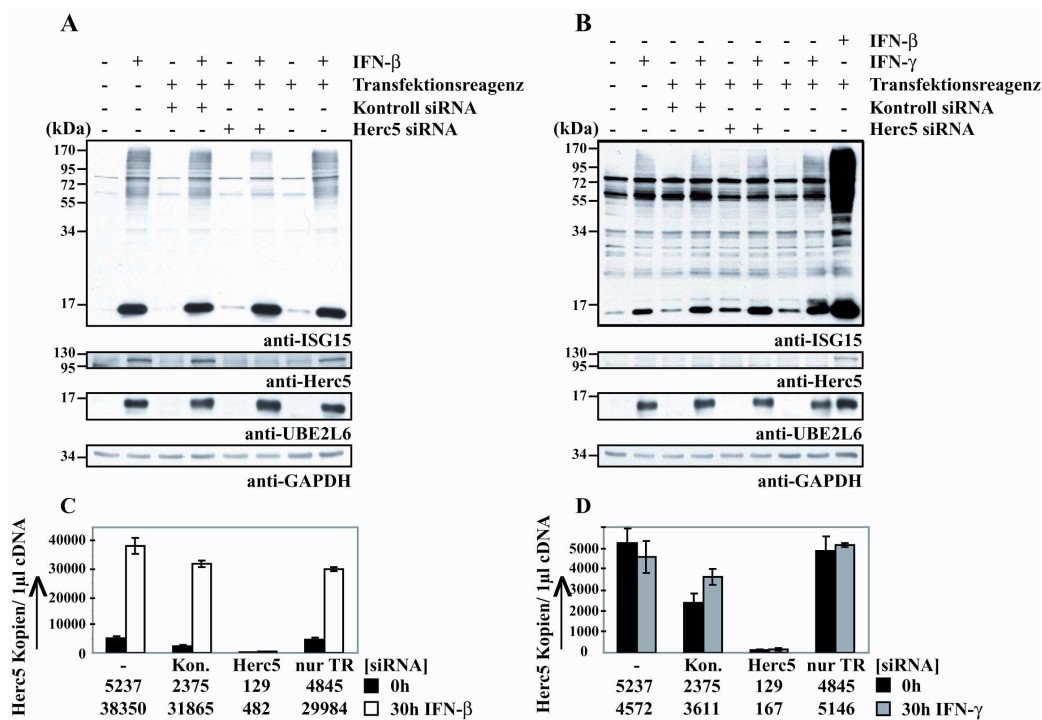


Abbildung 16: Inhibition der Expression von Herc5

HeLa Zellen wurden transient mit siRNA gegen Herc5 oder Kontroll siRNA mit einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 30h Inkubation mit 10ng/ml IFN- β (A, C) oder 100U/ml IFN- γ (B, D). Die so behandelten Zellen wurden geteilt. Aus einem Teil wurden Ganzzelllysate (GZL) hergestellt und je 25 μ g GZL sind in einer 12,5%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt worden. Nach dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, Herc5, UBE2L6 oder GAPDH als Ladekontrolle (A, B). Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die Expression von Herc5 mittels Real-time PCR analysiert (C, D). Alle graphisch aufgeführten Werte wurden gegen HPRT normalisiert und sind Mittelwerte, sowie Standardabweichungen aus 2 Experimenten und geben die Herc5 Kopien/ 1 μ l eingesetzter cDNA an. Kon. = Kontroll siRNA, nur TR = nur Transfektionsreagenz

Die Ergebnisse in Abbildung 16C und D zeigen eine effiziente Inhibition der Expression von Herc5 auf mRNA-Ebene. Dies kann ebenfalls auf Proteinebene nach IFN- β Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 16A). Des Weiteren beeinflusst die Transfektion von Herc5 siRNA nicht die Expression von freiem ISG15 oder UBE2L6 auf Proteinebene. Erwartungsgemäß wurde eine deutlich geringere Menge an ISGylierten Proteinen nach IFN- β Stimulation in Abwesenheit von Herc5 im Vergleich zu Kontroll siRNA Bedingungen detektiert. Die verbleibenden ISG15-Konjugate weisen darauf hin, dass mindestens eine andere E3-Ligase an der ISGylierung von Proteinen beteiligt ist. Die Menge an ISG15-Konjugaten nach IFN- γ Stimulation verändert sich zwischen Herc5 und Kontroll siRNA Bedingungen jedoch nicht (Abbildung 16B). Trotz der weiteren Reduktion der Herc5 Menge bleibt die IFN- γ induzierte ISGylierung unbeeinflusst, was darauf hinweist, dass Herc5 nach IFN- γ Stimulation keine funktionelle ISG15 E3-Ligase ist.

Durch die transiente Inhibition der Expression von UBE2L6, TRIM25 und Herc5 durch siRNA Experimente konnte gezeigt werden, dass weder TRIM25 noch Herc5 als E3-Ligasen für die IFN- γ vermittelte ISGylierung zuständig sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mindestens eine andere E3-Ligase die Ligation von ISG15 an zu modifizierende Proteine übernimmt. Des Weiteren ist eine Bildung von ISGylierten Proteinen durch Inhibition der Expression von UBE2L6 nach IFN- γ Stimulation nicht detektierbar, was dafür spricht, dass UBE2L6 das einzige beteiligte E2-Enzym nach IFN- γ Stimulation ist. Dies lässt vermuten, dass UBE2L6 zusammen mit mindestens einer anderen noch nicht identifizierten E3-Ligase die Bildung von ISG15-Konjugaten übernimmt.

3.6 Identifizierung von E3-Ligasen

Zur Identifizierung von E3-Ligasen die mit UBE2L6 interagieren, wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen sollten Immunpräzipitationsexperimente mit HA-UBE2L6 durchgeführt werden, um interagierende E3-Ligasen zu detektieren. Zum anderen sollten E3-Ligasen, deren Genexpression nach Interferonstimulation hochreguliert ist, sowie E3-Ligasen die in der Literatur als Interaktionspartner von UBE2L6 identifiziert wurden, in siRNA Experimenten auf ihre Beteiligung an der ISGylierung untersucht werden.

3.6.1 Immunpräzipitation mit HA-UBE2L6

Im ersten experimentellen Ansatz zur Identifizierung von mit UBE2L6 interagierenden E3-Ligasen, wurde eine Immunpräzipitation mit HA-UBE2L6 durchgeführt. Dafür ist HA-UBE2L6 in An- bzw. Abwesenheit von IFN- β in HeLa Zellen überexprimiert worden (Abbildung 17). Um die generelle Funktionalität des Immunpräzipitationsansatzes zu untersuchen, wurde die IFN- β Stimulation gewählt, da bekannt ist, dass UBE2L6 und Herc5 unter diesen Bedingungen interagieren.

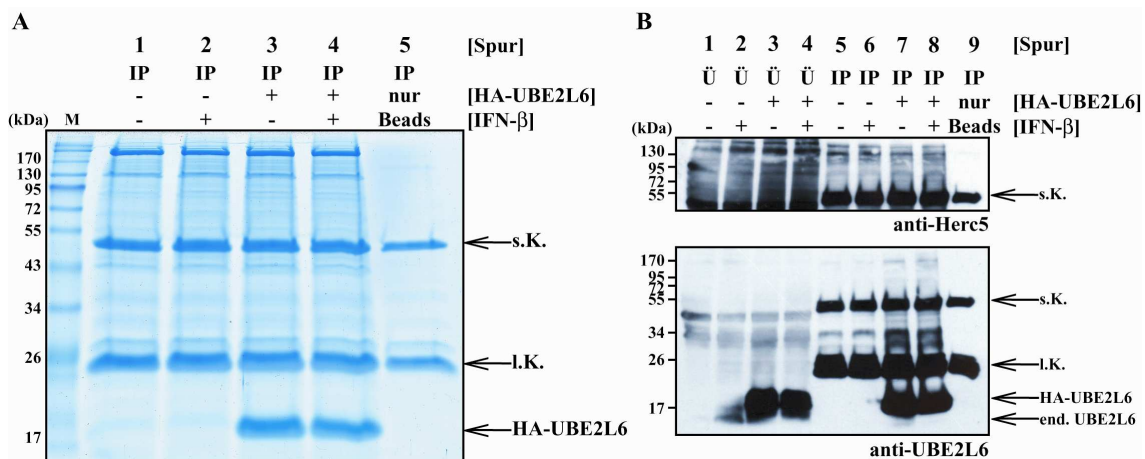


Abbildung 17: Immunpräzipitation von HA-UBE2L6 und interagierenden Proteinen

HeLa Zellen wurden transient mit HA-UBE2L6 transfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte eine 24h Inkubation mit 10ng/ml IFN- β . Die Zellen wurden in HEPES-Puffer lysiert. HA-UBE2L6 ist mit Anti-HA Affinity Gel immunpräzipitiert und anschließend über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt worden. **A)** Coomassiegefärbte SDS-PAGE der Immunpräzipitationsproben. **B)** Immundetektion von Herc5 und UBE2L6 nach SDS-PAGE und Western Blot. IP = Immunpräzipitat, Ü = Überstand der IP (nicht präzipitiertes Ganzzelllysate), nur Beads = Beadkontrolle ohne Ganzzelllysate, s.K. = schwere Antikörperkette, l.K. = leichte Antikörperkette, end.UBE2L6 = endogenes UBE2L6, M = Molekulargewichtsmarker

Sowohl die Überexpression, als auch die Immunpräzipitation (IP) von HA-UBE2L6 ist in der Coomassiegefärbten SDS-PAGE und nach Immundetektion mit einem UBE2L6 Antikörper zu erkennen (Abbildung 17A und B). Weiterhin sind die schwere und die leichte Kette des HA-Antikörpers in allen IP-Proben in gleicher Menge detektierbar, wodurch eine Vergleichbarkeit der IPs untereinander gegeben ist. Erwartungsgemäß sollten mit UBE2L6 assoziierte Proteine distinkte Banden in der Coomassiegefärbten SDS-PAGE ergeben. In Abbildung 17A sind jedoch keine Unterschiede in der Bandenverteilung und Intensität zwischen uninduzierten und IFN- β induzierten HA-UBE2L6 exprimierenden Zellen in Spur 3 und 4 erkennbar. Ebenfalls

wurden keine Unterschiede zwischen IFN- β induzierten Zellen in Spur 2 und IFN- β induzierten HA-UBE2L6 exprimierenden Zellen in Spur 4 detektiert.

Das UBE2L6 und Herc5 nach IFN- β Stimulation interagieren, ist bekannt (Dastur et al 2006). Da die Menge der an UBE2L6 assoziierten Proteine sehr gering sein kann und die Gelfärbung von Proteinen mit Coomassie brilliant blue nicht sensitiv genug sein könnte, wurde eine Immundetektion mit Herc5 Antikörpern durchgeführt (Abbildung 17B). Das ca.117kDa große Herc5 ist jedoch nicht in Spur 8 detektierbar, kann aber auch nicht in den Überständen nach der IP von Spur 2 oder 4 detektiert werden. Dies könnte dafür sprechen, dass der Herc5 Antikörper in diesem Experiment nicht funktioniert hat. Weiterhin macht Abbildung 17A deutlich, dass dieser experimentelle Ansatz nicht zur Identifizierung von interagierenden E3-Ligasen zu führen scheint.

3.6.2 Microarray-Analyse von Interferon regulierten E3-Ligasen

Im zweiten experimentellen Ansatz zur Identifizierung von E3-Ligasen wurde die Genexpression aller humanen Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach IFN- α , IFN- β und IFN- γ Stimulation in HeLa Zellen im Microarray analysiert.

Gen/ Protein Name	n-fach Expression											
	Interferon α				Interferon β				Interferon γ			
	4h	8h	25h	42h	4h	8h	25h	42h	4h	8h	25h	42h
TRIM22	2,76	30,00	20,15	25,47	1,76	34,14	133,27	142,06	2,04	6,46	39,93	28,75
RNF31	9,89	9,30	8,85	9,73	9,10	9,69	11,41	12,58	6,99	6,72	7,11	8,07
DTX3L	5,58	6,96	5,47	6,16	5,56	7,86	7,19	8,08	5,77	7,05	7,04	6,55
TRIM21	5,30	4,91	3,21	3,76	5,19	6,88	5,97	6,05	4,11	4,59	4,41	1,60
RNF36	3,31	3,57	2,90	3,89	3,11	3,91	4,24	5,68	4,45	5,08	5,98	7,78
TRIM6-TRIM34	1,65	3,97	2,64	3,91	1,66	4,23	3,71	4,20	1,03	1,56	1,73	1,37
TRIM38	2,01	2,22	2,02	1,98	2,09	3,15	3,52	3,42	1,88	1,89	2,01	1,84
PCGF5	1,36	2,41	2,32	1,93	1,44	2,71	4,89	3,91	1,42	2,59	3,25	2,33
IBRDC3	1,65	1,46	1,29	1,37	1,84	2,05	1,90	1,79	2,53	2,22	2,55	1,55
C20orf18	1,29	1,66	1,26	1,26	1,24	1,63	1,45	1,41	1,25	1,69	1,45	2,20
TRIM5	1,73	3,38	2,13	2,70	1,55	3,82	3,74	4,23	1,04	1,25	1,47	0,98
TRIM56	1,54	1,51	0,87	0,99	1,58	1,97	1,43	1,19	1,66	1,60	1,24	0,66
IBRDC2	1,06	1,28	1,46	1,21	1,09	1,20	1,31	1,46	3,83	2,41	1,61	5,68

Abbildung 18: Genexpressionsanalyse von Interferon induzierten E3-Ligasen

HeLa Zellen wurden mit 10ng/ml IFN- α , 10ng/ml IFN- β oder 100U/ml IFN- γ für unterschiedliche Zeiträume inkubiert. Nach der Isolierung von Gesamt-RNA wurde die Genexpression aller humanen Gene im Human U133 2.0 Plus-Array analysiert. Alle aufgeführten Kandidaten sind als E3-Ligasen klassifizierte Enzyme und deren Expression ist min. 2fach höher als in unstimulierten HeLa Zellen.

In Abbildung 18 sind alle als E3-Ligasen klassifizierten Enzyme aufgeführt, deren Genexpression nach IFN- α , IFN- β und/ oder IFN- γ Stimulation mindestens um das 2fache über der Expression von unstimulierten Zellen lag. Diese wurden in siRNA Experimenten auf ihre Beteiligung an der Interferon induzierten ISGylierung untersucht.

3.6.3 Mit UBE2L6 interagierende E3-Ligasen

Literaturrecherchen haben weiterhin ergeben, dass eine Vielzahl von E3-Ligasen mit UBE2L6 interagiert. Die in Abbildung 19 aufgelisteten Enzyme wurden für die siRNA Experimente ausgewählt. PJA2, MAP3K1, TOPORS, RNF122, RNF25 und RNF150 wurden als Interaktionspartner mit UBE2L6 in einem Yeast-two hybrid screen identifiziert (van Wijk et al 2009). Die Bindung von UBE3A (E6AP) an UBE2L6 konnte ebenfalls durch ein Yeast-two hybrid Experiment gezeigt werden. In anschließenden Überexpressionsanalysen wurde die Funktionalität von UBE2L6 und UBE3A durch Ubiquitinierung des Modellsubstrats HHR23A bewiesen (Kumar et al 1997). In Überexpressions- und Präzipitationsexperimenten wurde die Interaktion von UBE2L6 mit ARIH1 (HHARI) und PARC (H7-AP1) (Moynihan et al 1999), sowie mit RNF19 (Dorfin) analysiert (Niwa et al 2001).

Gen/ Protein Name	Interaktion mit UBE2L6, Bemerkung
UBE3A	(Kumar et al 1997), E6AP
ARIH1	(Moynihan et al 1999), HHARI
PARC	(Moynihan et al 1999), H7-AP1
RNF19	(Niwa et al 2001), Dorfin
PJA2	(van Wijk et al 2009)
MAP3K1	(van Wijk et al 2009)
TOPORS	(van Wijk et al 2009)
RNF122	(van Wijk et al 2009)
RNF25	(van Wijk et al 2009)
RNF150	(van Wijk et al 2009)

Abbildung 19: Interaktionspartner von UBE2L6

In der Literatur beschriebene E3-Ligasen die mit UBE2L6 interagieren.

3.6.4 siRNA-screen

Die durch Microarray-Analysen und Literaturrecherchen ausgewählten E3-Ligasen wurden in einem siRNA-screen auf ihre Beteiligung an der Interferon induzierten ISGylierung untersucht. Da in Abbildung 16 gezeigt wurde, dass in Abwesenheit von Herc5 sowohl nach IFN- β , als auch nach IFN- γ Stimulation ISG15-Konjugate gebildet werden, sollten die ausgewählten E3-

Ligasen nach beiden Stimuli untersucht werden. Dafür ist die Expression jeder E3-Ligase durch Transfektion spezifischer siRNA einzeln inhibiert worden. Der siRNA Transfektion schloss sich eine IFN- β (Abbildung 20) oder IFN- γ (Abbildung 21) Stimulation an. Um den Einfluss der jeweiligen E3-Ligasen auf die ISGylierung zu erfassen, wurde die Menge an immundetektierten ISGylierten Proteinen densitometrisch ausgewertet und in Bezug zur Kontroll siRNA gesetzt. Als Positivkontrolle diente die Inhibition der Expression von UBE2L6.

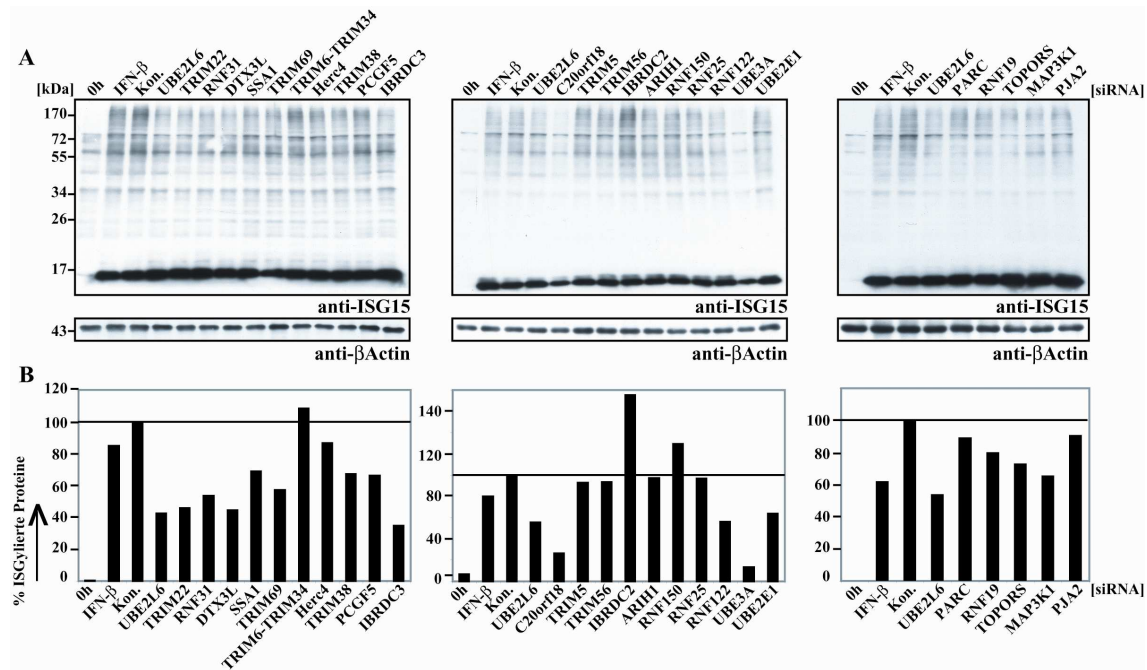


Abbildung 20: siRNA-screen nach IFN- β Stimulation

HeLa Zellen wurden einzeln mit den aufgeführten spezifischen siRNAs in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 30h Inkubation mit 10ng/ml IFN- β . Die Zellen wurden lysiert und je 25 μ g Ganzzelllysat ist in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt worden. (A) Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15 oder β Actin als Ladekontrolle. (B) Die densitometrische Auswertung der Menge der ISGylierten Proteine wurde gegen β Actin abgeglichen und ist in % angegeben. Dabei wurden die unter Kontroll siRNA Bedingungen detektierten ISGylierten Proteine als Bezugswerte gleich 100% gesetzt.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass durch die Inhibition der Expression von TRIM22, RNF31, DTX3L, TRIM69, IBRDC3, C20orf18, RNF122 und UBE3A die IFN- β induzierte ISGylierung um min. 40% in Bezug zur Kontroll siRNA verringert ist. Die Inhibition der Expression von UBE2L6 beeinflusst die ISGylierung in diesem Experiment im Vergleich zu Abbildung 14 weniger stark. Dies deutet auf eine geringere Effizienz der UBE2L6 siRNA Transfektion hin. Den deutlichsten Einfluss auf die ISGylierung hat UBE3A, welches in weiterführenden Experimenten nach IFN- β Stimulation untersucht werden sollte.

Abbildung 21 zeigt die ISGylierung in Abwesenheit der einzelnen E3-Ligasen nach IFN- γ Stimulation. Dabei ist zu erkennen, dass von den ausgewählten E3-Ligasen nur die Inhibition von IBRD3, C20orf18, IBRD2 und ARIH1 die ISGylierung um min. 25% in Bezug zur Kontroll siRNA verringert. Da in Abwesenheit von ARIH1 die ISGylierung verringert ist und ARIH1 als ISG15 E3-Ligase für 4EHP beschrieben wurde (Okumura et al 2007), wurde diese E3-Ligase für weitere Untersuchungen nach IFN- γ Stimulation ausgewählt.

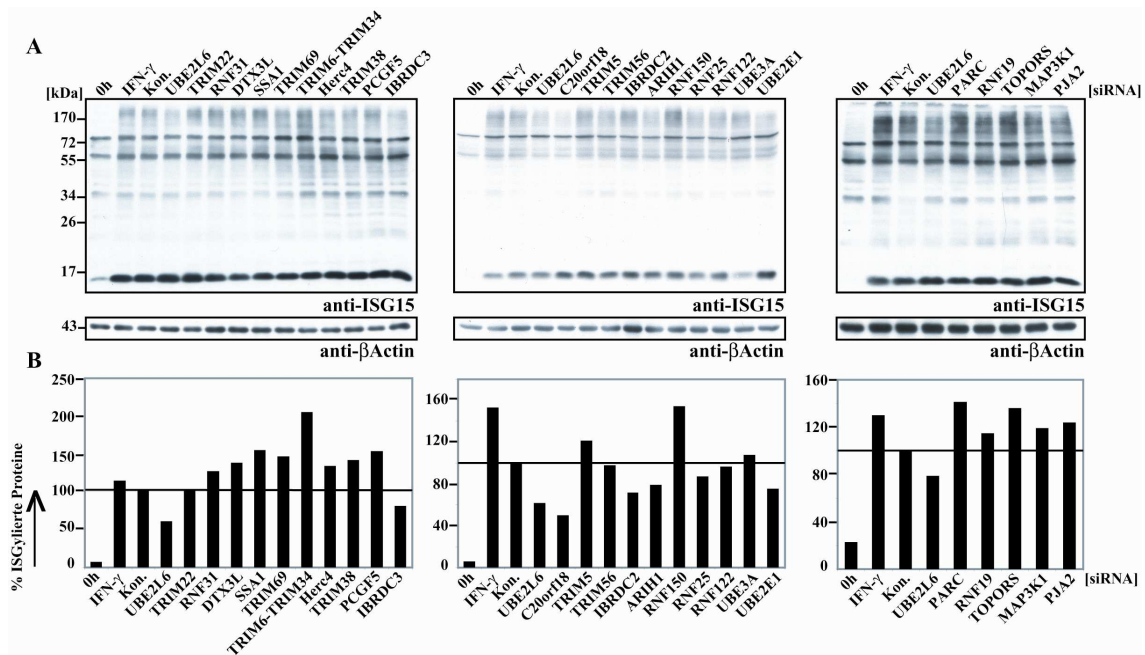


Abbildung 21: siRNA-screen nach IFN- γ Stimulation

HeLa Zellen wurden einzeln mit den aufgeführten spezifischen siRNAs in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 30h Inkubation mit 100U/ml IFN- γ . Die Zellen wurden lysiert und je 25 μ g Ganzzelllysat ist in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt worden. (A) Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15 oder β Actin als Ladekontrolle. (B) Die densitometrische Auswertung der Menge der ISGylierten Proteine wurde gegen β Actin abgeglichen und ist in % angegeben. Dabei wurden die unter Kontroll siRNA Bedingungen detektierten ISGylierten Proteine als Bezugswerte gleich 100% gesetzt.

3.6.5 Kinetische Untersuchung der Expressionsinhibition von UBE3A und ARIH1

Um den Einfluss von UBE3A auf die IFN- β induzierte ISGylierung zu untersuchen, wurde die Expression von UBE3A inhibiert und die IFN- β induzierte ISGylierung in Abhängigkeit der Zeit analysiert. Dies ist auch für den Einfluss von ARIH1 auf die IFN- γ induzierte ISGylierung durchgeführt worden. Die Menge der durch den ISG15-Antikörper detektierten ISGylierten Proteine wurden densitometrisch ausgewertet.

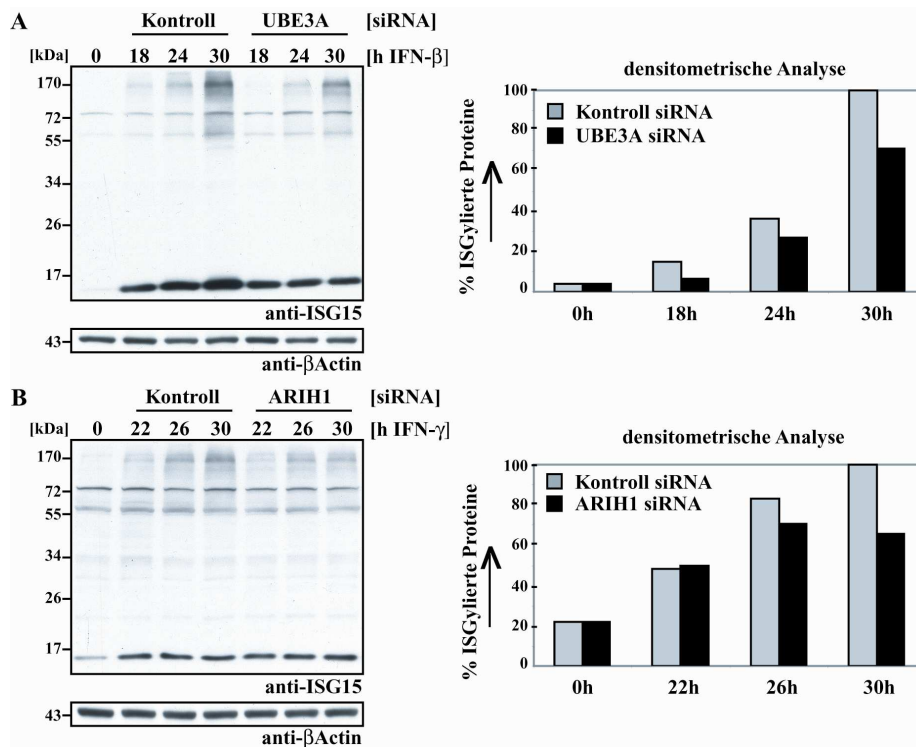


Abbildung 22: kinetische Analyse der Expressionsinhibition von UBE3A und ARIH1

HeLa Zellen wurden mit UBE3A siRNA (A) oder ARIH1 siRNA (B), sowie mit Kontroll siRNA in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 24h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 18h, 24h und 30h Inkubation mit 10ng/ml IFN-β (A) bzw. eine 22h, 26h und 30h Inkubation mit 100U/ml IFN-γ (B). Die Zellen wurden lysiert und je 25µg Ganzzelllysat sind in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt worden. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15 und βActin als Ladekontrolle. Die densitometrische Auswertung der Menge der ISGylierten Proteine wurde gegen βActin abgeglichen und ist in % angegeben. Dabei wurde jeweils die Menge an ISGylierten Proteinen unter Kontroll siRNA Bedingungen nach 30h IFN Stimulation als Bezugswerte gleich 100% gesetzt.

In Abbildung 22A ist zu erkennen, dass durch Inhibition der Expression von UBE3A nach IFN-β Stimulation die detektierte Menge an ISGylierten Proteinen zu jedem Zeitpunkt geringer ist als unter Kontroll siRNA Bedingungen. Im Vergleich zu Abbildung 20 ist in diesem Experiment der Effekt auf die ISGylierung nicht so stark ausgebildet, was an der Transfektionseffizienz liegen kann. In Abbildung 22B zeigt sich, dass in Abwesenheit von ARIH1 nach IFN-γ Stimulation die Menge an ISGylierten Proteinen nach 26h und 30h geringer ist als unter Kontroll siRNA Bedingungen. Die Menge der nach 30h detektierten ISGylierten Proteine ist mit dem Ergebnis aus Abbildung 21 vergleichbar. Die Effizienz der Transfektion von siRNA gegen UBE3A und ARIH1 sollte durch Immundetektion nach dem Western Blot mit Antikörpern gegen die jeweiligen Proteine nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass beide Antikörper nicht in der Lage sind, endogenes UBE3A bzw. ARIH1 zu detektieren. Die

Daten deuten darauf hin, dass UBE3A nach IFN- β Stimulation und ARIH1 nach IFN- γ Stimulation potentielle ISG15 E3-Ligasen sein können.

3.6.6 Überexpressionsanalyse von UBE3A und ARIH1

Die potentiellen ISG15 E3-Ligasen UBE3A und ARIH1 sollten in Überexpressionsexperimenten weiterhin auf ihre Fähigkeit zur Bildung von ISG15-Konjugaten untersucht werden.

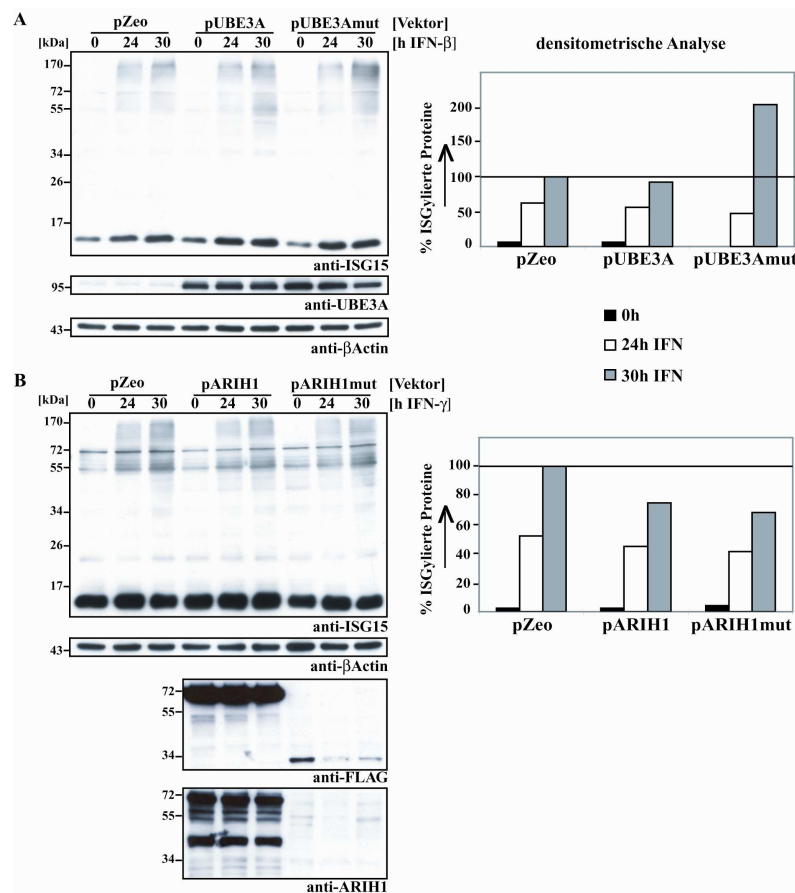


Abbildung 23: Überexpressionsanalyse von UBE3A und ARIH1

A) In HeLa Zellen wurden UBE3A und UBE3A mut für 24h überexprimiert und anschließend für 24h oder 30h mit 10ng/ml IFN- β stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und je 25 μ g Ganzzelllysat (GZL) wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, UBE3A oder β Actin als Ladekontrolle. **B)** Der 24higen Überexpression von ARIH1 und ARIH1 mut folgte eine 24h bzw. 30h Inkubation mit 100U/ml IFN- γ . Nach der Zelllyse wurden 25 μ g GZL in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, FLAG, ARIH1 oder β Actin als Ladekontrolle. **A+B)** Die densitometrische Auswertung der Menge der ISGylierten Proteine wurde gegen β Actin abgeglichen und ist in % angegeben. Dabei wurde jeweils die Menge an ISGylierten Proteinen in Bezug auf den Leervektor (pZeo) nach 30h IFN Stimulation (100%) berechnet. pZeo = pcDNA3.1/Zeo = Leervektor

Dafür wurden UBE3A, sowie eine katalytisch inaktive UBE3A-Mutante in HeLa Zellen überexprimiert und die Zellen mit IFN- β stimuliert. Analog dazu wurden in HeLa Zellen ARIH1, sowie eine katalytisch inaktive ARIH1-Mutante überexprimiert und mit IFN- γ stimuliert. Die katalytische Inaktivierung ist in der UBE3A-Mutante durch den Austausch von Cystein 833 durch Alanin (C833A) erfolgt. Bei der ARIH1-Mutante wurde die katalytisch aktive C-terminale Domäne von ARIH1 deletiert, weshalb das Molekulargewicht der Mutante deutlich geringer ist.

Die potentiellen ISG15 E3-Ligasen UBE3A und ARIH1 sollten durch Überexpression und in Anwesenheit aller anderen ISGylierungsenzyme die Menge an ISGylierten Proteinen erhöhen, welches bei den katalytisch inaktiven Mutanten nicht beobachtet werden sollte. In Abbildung 23A ist die Überexpression von UBE3A, sowie der Mutante mit dem UBE3A-Antikörper nachweisbar. Die Überexpression von ARIH1 in Abbildung 23B ist sowohl durch den ARIH1- als auch durch den FLAG-Antikörper detektierbar. Die ARIH1-Mutante lässt sich nur sehr schwach durch den FLAG-Antikörper nachweisen und ergibt kein Signal mit dem ARIH1-Antikörper. Abbildung 23A und B zeigen weder nach Überexpression von UBE3A noch von ARIH1 nach Immundetektion mit dem ISG15-Antikörper eine Zunahme von ISGylierten Proteinen im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Die densitometrische Auswertung macht deutlich, dass trotz im Überschuß vorliegendem UBE3A bzw. ARIH1 die Menge der ISGylierten Proteine unbeeinflusst bleibt bzw. sogar abzunehmen scheint. Eine Ausnahme stellt in Abbildung 23A der 30h Wert der UBE3A-Mutante dar. Dieser gibt eine 2fach höhere Menge an ISGylierten Proteinen im Vergleich zur 30h Leervektorkontrolle an.

3.6.7 Überexpressionsanalyse von UBE2L6 und Herc5

Die ISGylierung von Proteinen ist das Resultat eines Vorgangs an dem mehrere Komponenten beteiligt sind. Durch die Überexpression einer Komponente muss sich nicht zwangsläufig das Resultat ändern, da eine andere oder mehrere andere Komponenten limitierend sein können. Um zu überprüfen, ob nach IFN- β und IFN- γ Stimulation eine Limitierung der ISGylierungsenzyme vorliegt, wurden UBE2L6 als ISG15 E2-Enzym und Herc5 als wichtigste ISG15 E3-Ligase überexprimiert.

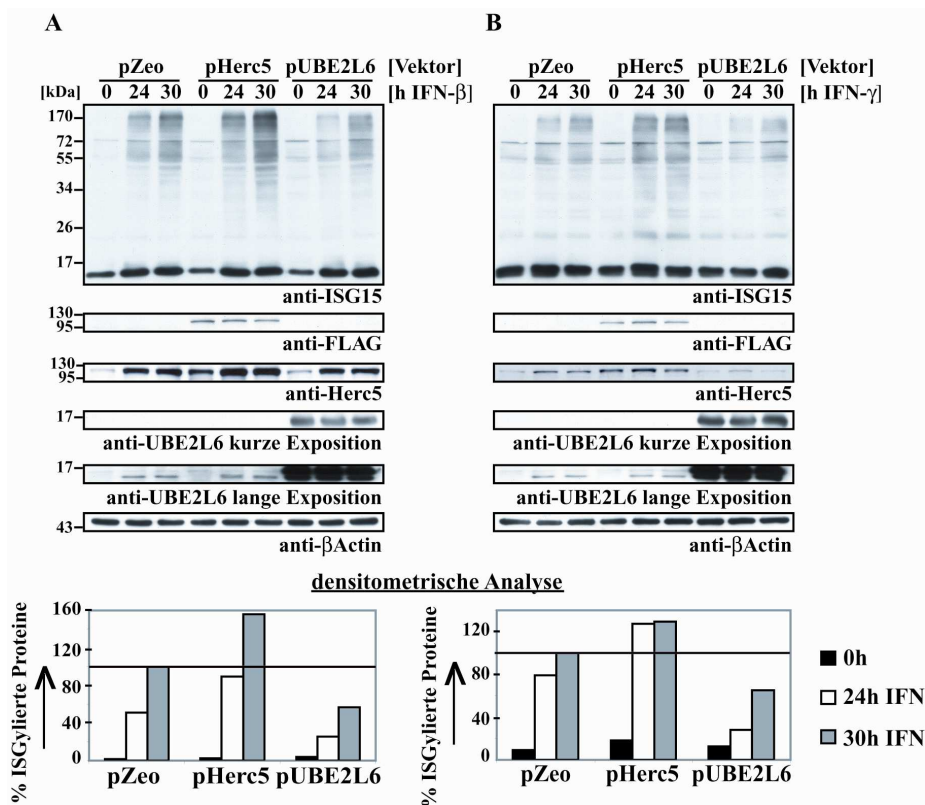


Abbildung 24: Überexpressionsanalyse von UBE2L6 und Herc5

In HeLa Zellen wurden Herc5 und UBE2L6 für 24h überexprimiert und anschließend für 24h oder 30h mit 10ng/ml IFN-β (A) oder mit 100U/ml IFN-γ (B) stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und je 25µg Ganzzelllysate wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, FLAG, Herc5, UBE2L6 oder βActin als Ladekontrolle. A+B) Die densitometrische Auswertung der Menge der ISGylierten Proteine wurde gegen βActin abgeglichen und ist in % angegeben. Dabei wurde jeweils die Menge an ISGylierten Proteinen in Bezug auf den Leervektor (pZeo) nach 30h IFN Stimulation (100%) berechnet. pZeo = pcDNA3.1/Zeo = Leervektor, pHerc5 = pcDNA3.1-Herc5 mit C-terminalem FLAG-tag, pUBE2L6 = pcDNA3.1-HA-UBE2L6

In Abbildung 24A ist die Überexpression von UBE2L6 und Herc5 nach IFN-β Stimulation dargestellt. Nach der Immundetektion mit FLAG-Antikörper ist zu erkennen, dass die Transfektion von pcDNA3.1-Herc5 zur Expression von Herc5 führt. Dies kann auch durch den Herc5-Antikörper bestätigt werden. Die Überexpression von UBE2L6 kann durch den UBE2L6-Antikörper detektiert werden. Die Transfektion von pcDNA3.1-Herc5 und pcDNA3.1-HA-UBE2L6 führt im Vergleich zur pcDNA3.1-Zeo Leervektorkontrolle zu keiner Veränderung der Expression des endogenen Herc5 bzw. UBE2L6. Nach der densitometrischen Auswertung von ISGylierten Proteinen zeigt sich, dass nach Überexpression von Herc5 im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine signifikant größere Menge an ISG15-Konjugaten

detektierbar ist. Dies zeigt sich nach Überexpression von UBE2L6 nicht, da die Menge an ISGylierten Proteinen im Gegensatz zur Leervektorkontrolle geringer ist. In Abbildung 24B ist der Einfluss der Überexpression von Herc5 und UBE2L6 nach IFN- γ Stimulation untersucht worden. Es ist zu erkennen, dass sowohl Herc5 als auch UBE2L6 überexprimiert werden. Die densitometrische Auswertung ergibt, dass eine Überexpression von Herc5 zu einer signifikant höheren Menge von ISGylierten Proteinen im Vergleich zur Leervektorkontrolle führt. Die prozentual detektierte Menge der ISG15-Konjugate nach Überexpression von UBE2L6 ist geringer als in der Leervektorkontrolle. Das Ergebnis der Überexpression von UBE2L6 deutet darauf hin, dass UBE2L6 keine limitierende Komponente der ISGylierung ist, da sich durch im Überschuss vorliegendes UBE2L6 die Menge an ISGylierten Proteinen nicht ändert. Die erhöhte Menge an gebildeten ISG15-Konjugaten nach Überexpression von Herc5 weist zum einen darauf hin, dass Herc5 eine limitierende Komponente darstellt. Zum anderen zeigt dieses Experiment, dass die Möglichkeit besteht durch Überexpression einer E3-Ligase die Bildung von ISGylierten Proteinen zu erhöhen.

In Abbildung 24B ist nach Immundetektion mit dem Herc5-Antikörper zu erkennen, dass in HeLa Zellen nach Leervektor und in geringerem Maß nach pcDNA3.1-HA-UBE2L6 Transfektion auch endogenes Herc5 nach IFN- γ Stimulation exprimiert wird. Zusätzlich erkennt man in Plasmid-DNA transfizierten aber nicht mit IFN stimulierten Zellen eine starke Expression von endogenem freien ISG15. Es wurde zum einen in Kapitel 3.3 gezeigt, dass ISG15 erst durch IFN Stimulation induziert wird. Zum anderen wurden in Kapitel 3.3 und 3.5 gezeigt, dass Herc5 nach IFN- γ Stimulation weder exprimiert wird noch an der IFN- γ induzierten ISGylierung beteiligt ist. Daher deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Transfektion von Plasmid-DNA die Expression von ISG15 und Herc5 und als Resultat daraus auch die ISGylierung beeinflusst.

3.6.8 Überexpressionsanalyse von UBE3A und ARIH1 in Abwesenheit von Herc5

Da die Transfektion von Plasmid-DNA zu einer höheren Herc5 Expression und damit auch zu einer gesteigerten ISGylierung führt, sollte geklärt werden, ob die gesteigerte Expression von Herc5 die Ergebnisse der UBE3A und ARIH1 Überexpression aus Abbildung 23 beeinflusst. Dafür wurde in Abbildung 25 die Expression von Herc5 in HeLa Zellen transient inhibiert. Anschließend folgte die IFN- β Stimulation, sowie die Überexpression von UBE3A und

UBE3Amut (Abbildung 25A) bzw. die IFN- γ Stimulation mit anschließender Überexpression von ARIH1 und ARIH1mut (Abbildung 25B).

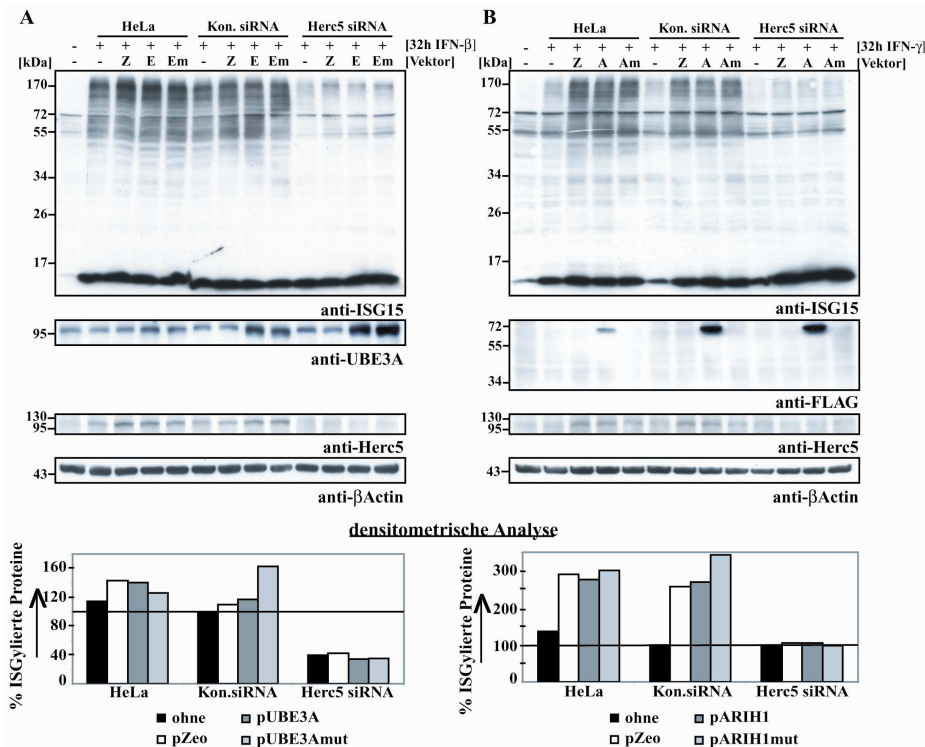


Abbildung 25: Inhibition der Expression von Herc5 und Überexpression von UBE3A und ARIH1

A) HeLa Zellen wurden mit Herc5 siRNA und Kontroll siRNA in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 16h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 32h Inkubation mit 10ng/ml IFN- β . 24h nach der siRNA Transfektion (8h nach IFN Stimulation) wurden UBE3A, UBE3Amut und der Leervektor (pZeo) überexprimiert. Die Zellen wurden lysiert und je 25 μ g Ganzzelllysat (GZL) wurden in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, UBE3A, Herc5 oder β Actin als Ladekontrolle. **B)** HeLa Zellen wurden mit Herc5 siRNA und Kontroll siRNA in einer Endkonzentration von 25nM transfiziert. 16h nach der siRNA Transfektion erfolgte eine 32h Inkubation mit 100U/ml IFN- γ . 24h nach der siRNA Transfektion (8h nach IFN Stimulation) wurden ARIH1, ARIH1mut und der Leervektor (pZeo) überexprimiert. Nach der Zelllyse wurden 25 μ g GZL in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dem Western Blot folgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen ISG15, FLAG, Herc5 oder β Actin als Ladekontrolle. **A+B)** Die densitometrische Auswertung der Menge der ISGylierten Proteine wurde gegen β Actin abgeglichen und ist in % angegeben. Dabei wurde die Menge an ISGylierten Proteinen in mit Kontroll siRNA ohne Plasmid-DNA transfizierten Zellen gleich 100% gesetzt. Z = pZeo = pcDNA3.1/Zeo = Leervektor, E = pUBE3A, Em = pUBE3Amut, A = pARIH1, Am = pARIH1mut, ohne = ohne Plasmid-DNA transfiziert = nur Transfektionsreagenz

In Abbildung 25A ist nach Immundetektion die Überexpression von UBE3A und UBE3Amut dargestellt. Ebenso ist die Inhibition der Expression von Herc5 auf Proteinebene detektierbar. Die densitometrische Auswertung zeigt, dass in Abwesenheit von Herc5 weniger ISG15-Konjugate gebildet werden als unter Kontroll siRNA Bedingungen oder in HeLa Zellen die

nicht mit siRNA behandelt wurden. Dies entspricht der Erwartung. Nach Überexpression von UBE3A unterscheidet sich die Menge der ISGylierten Proteine nicht von der detektierten Menge nach Leervektortransfektion. Weiterhin sind keine Unterschiede in der Menge der ISGylierten Proteine nach Inhibition der Expression von Herc5 zwischen der Überexpression von UBE3A und UBE3A_{mut} zu erkennen. In Abbildung 25B ist die IFN- γ induzierte ISGylierung nach Überexpression von ARIH1 und ARIH1_{mut} in HeLa Zellen, sowie nach Kontroll siRNA und Herc5 siRNA Transfektion dargestellt. Nach Immundetektion mit FLAG-Antikörper ist die Überexpression von ARIH1 detektierbar, jedoch nicht die der ca. 35kDa großen ARIH1-Mutante. Dies könnte an der Detektionsgrenze des FLAG-Antikörpers liegen. Weiterhin ist die Expression von Herc5 in HeLa Zelllysaten und in Kontroll siRNA Zelllysaten, die mit Plasmid-DNA transfiziert wurden, erkennbar. Die densitometrische Analyse zeigt, dass in diesen Proben die Menge der ISGylierten Proteine im Vergleich zum Kontrollwert stark erhöht ist. Zellen in denen die Expression von Herc5 inhibiert ist, zeigen keine Unterschiede in der Menge der ISGylierten Proteine im Vergleich zum Kontrollwert. Die ARIH1 Überexpression führt in Abwesenheit von Herc5 nicht zu einer Erhöhung von ISG15-Konjugaten. Des Weiteren sind auch keine Unterschiede in der Menge der ISGylierten Proteine zwischen ARIH1 und der ARIH1-Mutante erkennbar.

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die durch Typ I und Typ II Interferone induzierte ISGylierung auf der Ebene der E3-Ligasen unterscheidet. Während nach Typ I Interferon Stimulation die E3-Ligase Herc5 für die Ligation von ISG15 an den größten Teil der zu modifizierenden Proteine sorgt, konnte gezeigt werden, dass Herc5 nach Typ II Interferon Stimulation keinen Einfluss auf die ISGylierung hat. Weiterhin konnte der Einfluss der E3-Ligase TRIM25 auf die ISGylierung nach Typ II Interferon Stimulation ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von siRNA-Experimenten wurden die zwei E3-Ligasen UBE3A und ARIH1 identifiziert. Dadurch konnte der Einfluss von UBE3A auf die IFN- β (Typ I Interferon) induzierte ISGylierung nachgewiesen werden und für die IFN- γ (Typ II Interferon) induzierte ISGylierung wurde der Einfluss von ARIH1 gezeigt. Auch wenn die Überexpression dieser beiden E3-Ligasen die ISGylierung nicht erhöht, so haben die vorangegangenen Experimente gezeigt, dass es sich um potentielle ISG15 E3-Ligasen handelt.

4 Diskussion

Infiziert sich ein Organismus mit Pathogenen wie z.B. Viren, dann reagiert dieser mit einer Immunantwort, um die Virusinfektion abzuwehren. Nach einer Virusinfektion werden innerhalb kurzer Zeit Typ I Interferone, im wesentlichen IFN- α und IFN- β gebildet. Diese werden dann von der infizierten Zelle sezerniert und können sowohl an der gleichen Zelle oder an umliegenden Zellen binden und so die Expression von ISGs induzieren. Die Genprodukte der ISGs tragen entweder direkt zur Hemmung der Virusreplikation bei, wie beispielsweise 2',5'-OAS und PKR, oder indirekt wie IRF7 und IFN- γ (Paun & Pitha 2007). Das gebildete Typ II Interferon, IFN- γ , wird sezerniert und bindet an umliegende Zellen und ist dann seinerseits in der Lage für die Transkription von IFN- γ stimulierbaren Genen zu sorgen, die ebenfalls immunmodulierende und antivirale Aktivitäten übernehmen (Gough et al 2008). Man spricht im Allgemeinen vereinfacht davon, dass Typ I Interferone die erste Abwehrreaktion auslösen und dass das Typ II Interferon als zweiter Abwehrmechanismus folgt, um die Virusinfektion effizient zu bekämpfen.

ISG15 ist eines der am stärksten induzierten ISGs nach Typ I Interferon Stimulation, sowie nach viralen und bakteriellen Infektionen und wirkt inhibitorisch auf die Replikation von beispielsweise HIV-1 und Ebola Viren (Pitha-Rowe & Pitha 2007). Nach Typ II Interferon Stimulation konnte ebenfalls in z.B. A-549 Zellen eine Induktion der Expression von ISG15 nachgewiesen werden (Haas et al 1987). Die Regulation und Funktion von ISG15 und der ISGylierung wurde nach Typ I Interferon Stimulation vielfältig untersucht, wohingegen kaum Daten über den Einfluss von Typ II Interferon auf ISG15 und die ISGylierung vorliegen. Auf Grund dessen sollte in dieser Arbeit die Regulation von ISG15, der Enzymkaskade und der ISGylierung von Proteinen nach Typ I und Typ II Stimulation vergleichend untersucht werden.

4.1 Regulation von ISG15 und der ISGylierung nach Interferon Stimulation

Für die ISGylierung von Proteinen ist es nicht nur notwendig die Expression von ISG15 zu induzieren, sondern auch die Expression der Enzyme, die für die Verknüpfung von ISG15 an die zu modifizierenden Proteine sorgen. Alle an der ISGylierung beteiligten Enzyme sind Typ I Interferon induzierbar. Loeb und Haas konnten zeigen, dass die Expression von freiem ISG15 und die Bildung von ISG15-Konjugaten einer biphasischen Kinetik folgen, d.h. die Expression von freiem ISG15 ist innerhalb von 4h nach IFN- β Stimulation zu beobachten, wobei die Formation der ISG15-Konjugate erst nach etwa 18h detektiert wird (Loeb & Haas 1992). Die

zum freien ISG15 zeitlich verzögerte Bildung von ISG15-Konjugaten wurde in Zusammenhang mit der späteren Expression der Enzyme, die an der ISGylierung beteiligt sind, gebracht (Jeon et al 2010). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit in HeLa Zellen bestätigt werden (Kapitel 3.3, Abbildung 10 bis Abbildung 12). Die Ergebnisse machen deutlich, dass die spätere Bildung von ISG15-Konjugaten, im Vergleich zur Expression von freiem ISG15, von der verzögerten Translation der an der ISGylierung beteiligten Enzyme abhängt. Posttranskriptionelle Genregulationsmechanismen beeinflussen wie effizient und wann eine mRNA translatiert wird und beinhalten Mechanismen wie die Prozessierung, den Transport, sowie Export der mRNAs aus dem Zellkern und deren Lokalisation im Cytoplasma (Lackner & Bahler 2008). Beispielsweise könnte die verzögerte Translation auf die Bindung von kurzen nicht-codierenden microRNAs (miRNAs) an die 3' untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNAs zurückzuführen sein. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die let-7 miRNA u.a. zusammen mit DICER, *Argonaute 1 und 2* Proteinen (Ago1 und Ago2), sowie dem Translationsrepressor RCK/p54 den miRISC-Komplex bildet, welcher über die let-7 miRNA durch imperfekte Basenpaarung an die let-7 Ziel-mRNA bindet. Bilden sich viele der miRISC Ziel-mRNA Komplexe, akkumulieren diese in so genannten *processing bodies* (P-bodies). In den P-bodies wird die mRNA gespeichert und kann zu einem späteren Zeitpunkt durch bestimmte Stimuli dem Translationsprozess zugeführt werden (Chu & Rana 2006). Weiterhin wäre es denkbar, dass inhibitorisch wirkende Proteine an der 3'-UTR bzw. 5'-UTR der mRNAs binden und so die Translation verzögern. Auch die Bildung von Sekundärstrukturen im Bereich der 5'-UTR kann dazu führen, dass die mRNA weniger effizient translatiert wird (Mignone et al 2002). Anhand dieser Beispiele für posttranskriptionelle Genregulationsmechanismen könnte die verzögerte Translation der an der ISGylierung beteiligten Enzyme erklärt werden.

Weiterhin lässt sich eine geringere Menge an ISG15-Konjugaten nach IFN- α als nach IFN- β Stimulation detektieren. Sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene wird deutlich, dass nach IFN- β Stimulation ISG15 und alle Enzyme stärker induziert werden als nach IFN- α Stimulation (Abbildung 10 und Abbildung 12). Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der IFN- α Subtypen gegenüber des IFN- β Proteins an die Rezeptoren IFNAR-1 und IFNAR-2 erklären. Binden Typ I Interferone an ihre Rezeptoren, dann bildet sich ein ternärer Komplex bestehend aus IFNAR-2/ IFN/ IFNAR-1, wobei das IFN zuerst an IFNAR-2 bindet und dann IFNAR-1 rekrutiert. Es wurde gezeigt, dass die Bindungsaffinität verschiedener IFN- α Subtypen zu den Rezeptoren geringer ist, als die von

IFN- β und daraus resultierend beispielsweise die Bildung des Transkriptionsfaktors ISGF3 weniger stark aktiviert wird. Typ I Interferone benutzen zwar den gleichen Rezeptorkomplex, aber auf Grund der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten sind sie so in der Lage unterschiedlich starke Signale zu erzeugen (Genin et al 2009, Jaks et al 2007). Dies erklärt die geringere Induktion der an der ISGylierung beteiligten Enzyme nach IFN- α Stimulation und somit auch die geringere Menge an detektierten ISGylierten Proteinen. Auch die nach IFN- α Stimulation weniger starke Induktion des Interferon-regulatorischen Faktors IRF7 (Abbildung 13), dessen Transkription von ISGF3 induziert wird, lässt sich somit erklären.

Die in HeLa Zellen beobachtete Typ II Interferon vermittelte Expression von ISG15 und die Bildung von ISG15-Konjugaten folgen ebenfalls einer biphasischen Kinetik (Abbildung 10). Im Gegensatz zur Typ I Interferon Stimulation wird die Transkription von ISG15 durch IFN- γ jedoch wesentlich schwächer induziert (Abbildung 12). Es stellte sich die Frage, ob die beobachtete schwache Expression von ISG15 und die Formation von ISG15-Konjugaten direkt von IFN- γ induziert, oder indirekt über IFN- α und IFN- β vermittelt wird. IFN- γ aktiviert in erster Linie den Transkriptionsfaktor GAF, ein Homodimer aus phosphoryliertem STAT1, der durch Bindung an GAS DNA-Sequenzmotive die Transkription von IFN- γ stimulierbaren Genen induziert. IFN- γ ist aber auch in der Lage über ISGF3, ein Komplex aus phosphoryliertem STAT1 und STAT2, sowie IRF9, in geringem Maß die Transkription von ISGs zu induzieren (Takaoka & Yanai 2006). Der Transkriptionsfaktor IRF7 gehört zu den induzierten ISGs und ist seinerseits für die Transkription von IFN- α und IFN- β verantwortlich. Die Expressionsanalyse in Abbildung 13 zeigt einerseits, dass IFN- γ nicht über IRF7 die Expression von IFN- α und IFN- β induziert. Andererseits schließt das Experiment die Kontamination des rekombinant aufgereinigten IFN- γ mit *Lipopolysaccharid* (LPS) aus. Bei der rekombinanten Aufreinigung von Proteinen aus *E.coli* Bakterien, bleibt meist das an der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien gebundene LPS als Verunreinigung in der Proteinfraction zurück. LPS kann dann über den TLR4 die Transkription von IFN- α und IFN- β und somit auch von IRF7 induzieren. Anhand dieses Experiments wurde gezeigt, dass IFN- γ direkt für die Expression von ISG15 und der Bildung der ISG15-Konjugate verantwortlich ist.

Durch die Analyse der an der ISGylierung beteiligten Enzyme auf Transkriptions- und Translationsebene sollte geklärt werden, welche Enzyme an der IFN- γ vermittelten ISGylierung

beteiligt sind (Abbildung 11 und Abbildung 12). In unterschiedlichen Studien wurde beobachtet, dass es eine Überschneidung bei der Expression von Proteinen gibt, die sowohl durch Typ I als auch durch Typ II Interferon Stimulation induziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich nach IFN- γ Stimulation ein Komplex aus einem phosphorylierten STAT1 Homodimer und IRF9 bildet, welches an das ISRE DNA-Sequenzmotiv bindet und die Transkription einiger ISGs induziert. Die Affinität der Bindung des STAT1 Homodimer/ IRF9 Komplexes an ISRE DNA-Sequenzmotive ist wesentlich geringer, als die des Transkriptionsfaktors ISGF3, bestehend aus STAT1/ STAT2/ IRF9. Daraus resultiert auch eine geringere Induzierbarkeit von ISGs durch den STAT1 Homodimer/ IRF9 Komplex (Bluyssen et al 1995, Schroder et al 2004, Wesoly et al 2007). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die geringere Hochregulation von ISG15, USP18 und TRIM25 nach IFN- γ Stimulation im Vergleich zu IFN- α und IFN- β Stimulation sein (Abbildung 10 und Abbildung 11). Weiterhin ist bekannt, dass ISGs durch verschiedene Interferon-regulatorische Faktoren (IRFs) induziert werden können. Während nach Typ I Interferon Stimulation IRF1, IRF3, IRF7 und IRF9 an der Regulation von ISGs beteiligt sind, wirken nach Typ II Interferon Stimulation nur IRF1 und IRF9 an der Induktion von ISGs mit (Wesoly et al 2007). Dies könnte bedeuten, dass nach IFN- γ Stimulation, trotz des Fehlens von IRF3 und IRF7, einige Gene, wie die von UBE1L und UBE2L6, durch die Faktoren IRF1 und IRF9 weiterhin stark induziert werden können (Abbildung 11). Für andere Gene könnte es der Fall sein, dass diese nur in Anwesenheit aller vier IRFs voll induziert werden. Dies wäre eine weitere Erklärung für die geringere Induktion der Gene von ISG15, USP18 und TRIM25 nach IFN- γ Stimulation. Das Fehlen von IRF3 und IRF7 ist möglicherweise der Grund, weshalb Herc5 nach Typ I Interferon Stimulation jedoch nicht nach Typ II Interferon Stimulation exprimiert wird (Abbildung 11).

4.2 Enzymbeteiligung an der IFN- γ vermittelten ISGylierung

Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 11 und Abbildung 12 stellte sich die Frage, welche der bekannten ISGylierungsenzyme an der IFN- γ induzierten ISGylierung beteiligt sind. In Abbildung 10 ist die Formation von ISG15-Konjugaten nach IFN- γ Stimulation eindeutig detektierbar, woraus sich schließen lässt, dass sowohl USP18, als auch UBE1L an der IFN- γ vermittelten ISGylierung beteiligt sind. Zum einen muss das Vorläuferprotein ISG17 durch C-terminale Prozessierung in die konjugierbare Form, dem ISG15, überführt werden, denn ausschließlich ISG15 kann an Proteine gebunden werden. USP18 ist die einzige charakterisierte

ISG15-spezifische Protease (Malakhov et al 2002). Aufgrund dessen, sowie der Induzierbarkeit von USP18 nach IFN- γ Stimulation (Abbildung 12) und der Detektion von ISG15-Konjugaten, wurde die Beteiligung von USP18 als gegeben angenommen. Da auch UBE1L das einzige ISG15-spezifische E1-Enzym ist, sowie durch IFN- γ Stimulation induziert wird (Abbildung 11 und Abbildung 12), wurde ebenfalls davon ausgegangen, dass UBE1L an der IFN- γ vermittelten ISGylierung beteiligt ist.

Da nicht nur UBE2L6, sondern auch Herc5 und TRIM25 sowohl mit ISG15 als auch mit Ubiquitin reagieren können, wurde deren Einfluss auf die ISGylierung mittels siRNA-Experimenten untersucht. Abbildung 14 macht deutlich, dass UBE2L6 eine zentrale Rolle als E2-Enzym einnimmt. Das UBE2L6 nach Typ I Interferon Stimulation das Haupt-E2-Enzym ist, wurde bereits von Takeuchi und Kollegen beschrieben (Takeuchi et al 2005). Das Experiment in Abbildung 14 zeigt deutlich, dass UBE2L6 auch die Funktion des Haupt-E2-Enzyms während der IFN- γ vermittelten ISGylierung übernimmt.

Für die Ligation von ISG15 an zu modifizierende Proteine nach Typ I Interferon Stimulation wurden bisher die beiden E3-Enzyme Herc5 und TRIM25 identifiziert. Nach IFN- γ Stimulation wird jedoch nur TRIM25 exprimiert (Abbildung 11 und Abbildung 12). Daraus ergab sich die Hypothese, dass Herc5 und TRIM25 nach Typ I Interferon Stimulation und nur TRIM25 nach Typ II Interferon Stimulation für die Ligation von ISG15 an zu modifizierende Proteine verantwortlich sind. Abbildung 15 zeigt jedoch, dass die Abwesenheit von TRIM25 weder nach IFN- β noch nach IFN- γ Stimulation einen Einfluss auf die Bildung der ISG15-Konjugate hat. Dieses Ergebnis zeigt, dass TRIM25 entweder keinen Einfluss auf die Typ I und Typ II Interferon vermittelte ISGylierung hat, oder dass der Einfluss nur sehr gering ist und somit mittels siRNA Experimenten nicht nachzuweisen ist. Es ist bekannt, dass TRIM25 während der Typ I Interferon vermittelten ISGylierung eine eher untergeordnete Rolle spielt, da es nur spezielle Proteine ISGyliert (Takeuchi et al 2006a). Dies könnte den nicht nachweisbaren Effekt von TRIM25 auf die ISGylierung erklären. Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der Expression von Herc5 nach IFN- β Stimulation zu einer Reduktion der Menge an ISG15-Konjugaten (Abbildung 16), welches ebenfalls von Dastur und Kollegen beschrieben wurde (Dastur et al 2006). Die weiterhin detektierbare Menge an ISGylierten Proteinen, weist darauf hin, dass mindestens eine andere E3-Ligase an der IFN- β vermittelten ISGylierung beteiligt ist. Dass die E3-Ligase Herc5 nicht an der IFN- γ vermittelten ISGylierung beteiligt ist, zeigen die Ergebnisse aus Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 16. Diese Ergebnisse machen

deutlich, dass weder TRIM25 noch Herc5 während der IFN- γ vermittelten ISGylierung eine Rolle spielen und deuten darauf hin, dass nach Typ II Interferon Stimulation ein oder mehrere andere E3-Enzyme an der Ligation von ISG15 an zu modifizierende Proteine beteiligt sein müssen.

Die vergleichende funktionelle Untersuchung der an der ISGylierung beteiligten Enzyme hat ergeben, dass Überschneidungen (USP18, UBE1L und UBE2L6) aber auch Unterschiede (E3-Ligasen) bei der Beteiligung der Enzyme nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation auftreten. Dies warf die Frage nach möglichen anderen ISG15 E3-Ligasen auf.

4.3 Identifizierung von E3-Ligasen

Um E3-Ligasen die an der ISGylierung beteiligt sind zu identifizieren, wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Durch Immunpräzipitationsexperimente mit HA-UBE2L6 sollten interagierende E3-Ligasen detektiert werden. Nach der Inhibition der Expression von UBE2L6 ist die Bildung von ISG15-Konjugaten nach IFN- β und IFN- γ Stimulation nicht mehr detektierbar (Abbildung 14). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass UBE2L6 nicht nur das Haupt-E2-Enzym, sondern das einzige E2-Enzym während der Interferon vermittelten ISGylierung in HeLa Zellen ist. Daraus ergab sich die Hypothese, dass UBE2L6 mit anderen noch nicht identifizierten E3-Ligasen die Bildung von ISG15-Konjugaten übernimmt. Mittels der Immunpräzipitation von HA-UBE2L6 konnten jedoch keine Proteine copräzipitiert werden (Abbildung 17A). Es ist bekannt, dass die Interaktion von E2 mit E3 Enzymen zwar sehr spezifisch ist, häufig jedoch die Assoziation sowie die Dissoziation dieser Komplexe sehr schnell ablaufen kann (Deshaies & Joazeiro 2009, Kleiger et al 2009). Daraus können sich Probleme bei der Copräzipitation ergeben. Durch schnelle Dissoziation der E2-E3-Komplexe kann beispielsweise die Menge an copräzipitierten Proteinen nicht mehr ausreichen, um sie detektieren zu können. Weiterhin wurde die Immunpräzipitation mit HA-UBE2L6 in Anwesenheit des endogenen UBE2L6 durchgeführt. Daraus ergibt sich, dass sowohl HA-UBE2L6 als auch das endogene UBE2L6 um Bindungspartner wie die E3-Ligasen konkurrieren und so wiederum die Menge an copräzipitierten Proteinen vermindert wird. Dies können mögliche Erklärungen dafür sein, dass insgesamt die Immunpräzipitation mit HA-UBE2L6 nicht zur Identifikation von assoziierten E3-Ligasen geführt hat.

Alle Enzyme die an der Typ I Interferon vermittelten ISGylierung beteiligt sind, werden durch Typ I Interferone induziert (Jeon et al 2010). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass weitere E3-Ligasen die an der IFN- β bzw. an der IFN- γ vermittelten ISGylierung beteiligt sind, ebenfalls durch diese Interferone induziert werden. Durch Genexpressionsanalysen von Interferon stimulierten HeLa Zellen wurden alle als E3-Ligasen klassifizierten Enzyme, dessen Expression nach IFN- α , IFN- β und/ oder IFN- γ induziert war, als potentielle E3-Ligase Kandidaten ausgewählt (Abbildung 18). Des Weiteren wurden durch Literaturrecherchen E3-Ligasen ermittelt, die mit UBE2L6 interagieren können (Abbildung 19). Diese potentiellen E3-Ligase Kandidaten wurden in einem zweiten experimentellen Ansatz, dem siRNA-screen, auf ihre Beteiligung an der Typ I oder Typ II Interferon induzierten ISGylierung untersucht (Abbildung 20). Den stärksten Einfluss auf die IFN- β induzierte ISGylierung hatte die Inhibition der Expression von UBE3A. Durch Inhibition der Expression von ARIH1 wurde nach IFN- γ Stimulation eine geringere Menge an ISG15-Konjugaten detektiert. Darüber hinaus haben Okumura und Kollegen gezeigt, dass ARIH1 in IFN- β stimulierten Zellen 4EHP ISGylieren kann (Okumura et al 2007).

4.4 Die potentiellen ISG15 E3-Ligasen UBE3A und ARIH1

Um den Einfluss der beiden potentiellen E3-Ligasen weiterführend zu untersuchen, wurde zum einen die ISGylierung in Abwesenheit der jeweiligen Enzyme in Abhängigkeit der Zeit untersucht und zum anderen wurden Überexpressionsanalysen der E3-Ligasen durchgeführt. Die kinetische Untersuchung der Expressionsinhibition von UBE3A und ARIH1 macht den funktionellen Einfluss von UBE3A nach IFN- β Stimulation und von ARIH1 nach IFN- γ Stimulation auf die ISGylierung deutlich (Abbildung 22). Die Überexpression von UBE3A nach IFN- β und die Überexpression von ARIH1 nach IFN- γ Stimulation hat jedoch keinen Einfluss auf Menge an ISGylierten Proteinen (Abbildung 23). Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass möglicherweise eine oder mehrere Komponenten innerhalb der ISGylierungskaskade limitierend sein könnten. Wenn dies der Fall ist, dann muss die Überexpression einer Komponente nicht zwangsläufig zur Erhöhung der ISGylierung führen. Um zu überprüfen, ob eine Limitierung der ISGylierungsenzyme vorliegt, wurden UBE2L6 und Herc5 sowohl nach IFN- β als auch nach IFN- γ Stimulation überexprimiert. Abbildung 24 macht deutlich, dass UBE2L6 keine limitierende Komponente während der Interferon vermittelten ISGylierung darstellt, da die Menge der ISG15-Konjugate unbeeinflusst bleibt. Wird jedoch Herc5

überexprimiert, dann erhöht sich die Menge der gebildeten ISGylierten Proteine sowohl nach IFN- β als auch nach IFN- γ Stimulation (Abbildung 24). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass es zum einen möglich ist durch Überexpression einer E3-Ligase die ISGylierung von Proteinen zu erhöhen und zum anderen, dass die Limitation der ISGylierung auf der Ebene der E3-Enzyme liegt. Die Überexpressionsanalyse von UBE2L6 und Herc5 in Abbildung 24 zeigt jedoch ebenfalls, dass die Expression von freiem ISG15 auch ohne Interferon Stimulation erhöht ist. Des Weiteren ist nach IFN- γ Stimulation die Expression von Herc5 deutlich induziert (Abbildung 24B). Da Herc5 jedoch nach IFN- γ Stimulation weder exprimiert wird (Kapitel 3.3), noch an der IFN- γ vermittelten ISGylierung beteiligt ist (Abbildung 16), zeigt dieses Experiment, dass die Transfektion von Plasmid-DNA die ISGylierung durch Hochregulation von ISG15 und Herc5 beeinflusst. Die für die Transfektion verwendete Plasmid-DNA stammt aus Bakterien. Die bakterielle DNA unterscheidet sich von Wirbeltier DNA u.a. durch die Häufigkeit von CpG-Motiven und deren Grad der Methylierung. Während in bakterieller DNA CpG-Motive relativ häufig auftreten, kommen sie in der DNA von Wirbeltieren seltener vor. Darüber hinaus sind die CpG-Motive von Bakterien kaum methyliert und die von Wirbeltieren sehr häufig. CpG-Motive von Wirbeltieren sind meist an der Regulation der Genexpression beteiligt und sind Regionen in denen vermehrt Cytosin-Guanin-Dinukleotide auftreten. Es ist bekannt, dass bakterielle Plasmid-DNA in Wirbeltieren die Produktion von Cytokinen stimuliert und eine Immunantwort auslöst. Durch das Entfernen von CpG-Motiven aus bakteriellen Vektoren konnte die Stimulation von Cytokinen und die somit ausgelöste Immunantwort aufgehoben werden (Hyde et al 2008, Krieg et al 1995, Yew et al 2000). Die bakteriellen unmethylierten CpG-Motive werden intrazellulär durch den TLR9 erkannt. Dadurch wird sowohl der Transkriptionsfaktor IRF7, als auch der NF- κ B Signalweg aktiviert, was zur Transkription von inflammatorischen Cytokinen, wie beispielsweise IFN- α und IFN- β und somit auch zur Transkription von ISGs führt (Paun & Pitha 2007). Da durch die Plasmid-DNA Transfektion auch Typ I Interferone gebildet werden, kann dies der Grund sein, weshalb ISG15 in plasmidtransfizierten Zellen ohne Interferon Stimulation exprimiert wird. Es erklärt auch die Hochregulation von Herc5 nach IFN- γ Stimulation in diesen Zellen. Aufgrund der Tatsache, dass durch Plasmid-DNA Transfektion die Expression von Herc5 stärker induziert wird und somit eine gesteigerte ISGylierung zur Folge hat, sollten die Überexpressionsexperimente mit UBE3A und ARIH1 in Abwesenheit von Herc5 wiederholt werden. Abbildung 25 zeigt, dass auch in Abwesenheit von Herc5 die Überexpression von UBE3A nach IFN- β , sowie die

Überexpression von ARIH1 nach IFN- γ Stimulation zu keiner Erhöhung der Menge an ISGylierten Proteinen führt. Dieses Ergebnis deutet entweder darauf hin, dass UBE3A und ARIH1 keinen Einfluss auf die ISGylierung haben, oder aber, dass beide E3-Ligasen sehr spezifische Substrate ISGylieren und diese limitierend auf die entstehende Menge der ISG15-Konjugate wirken. Beispielsweise ist bekannt, dass TRIM25 im Gegensatz zu Herc5, welches für die Ligation von ISG15 an den größten Teil der zu modifizierenden Proteine zuständig ist, nur einige spezielle Proteine ISGyliert (Takeuchi et al 2006a). Dies könnte für UBE3A nach IFN- β Stimulation und für ARIH1 nach IFN- γ Stimulation ebenfalls der Fall sein. Das in Abwesenheit der E3-Ligasen die ISGylierung verringert ist (Abbildung 22), sich aber durch Überexpression der E3-Enzyme nicht erhöht (Abbildung 25), könnte an der Limitation der Substrate liegen. D.h. selbst wenn die E3-Ligasen im Überschuss vorliegen, können sie aufgrund des nicht mehr Vorhandenseins von Substraten auch keine weitere ISGylierung vornehmen. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass in Abwesenheit der E3-Enzyme diese Substrate erst gar nicht ISGyliert werden und somit die Verringerung der Menge an ISG15-Konjugaten in den siRNA Experimenten erklärbar ist.

4.5 Relevanz und Ausblick

Die vergleichende Untersuchung der Regulation der ISGylierung nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation hat ergeben, dass sich diese auf Ebene der E3-Enzyme unterscheidet. Aus diesem Befund ergeben sich interessante Möglichkeiten der Relevanz dieser Unterschiede. Der Beteiligung unterschiedlicher E3-Ligasen könnte beispielsweise darauf hinweisen, dass verschiedene Substrate nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation ISGyliert werden. Für die Ubiquitinierung ist bekannt, dass die Substratspezifität von E3-Ligasen ausgeht (Ciechanover 2005). Das bedeutet, dass E3-Enzyme mit unterschiedlicher Spezifität Substrate binden können und sich diese Substrate meist zwischen den E3-Ligasen unterscheiden. Im Fall der ISGylierung wurde gezeigt, dass TRIM25 in Anwesenheit von UBE2L6 die Proteine STK38 und RGS3 in einem geringeren Maß ISGyliert als Herc5 und das Protein XBP nur von Herc5, aber nicht von TRIM25 ISGyliert wird (Takeuchi et al 2006a). Um eindeutig zu klären, ob sich die Zusammensetzung der ISGylierten Proteinen nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation voneinander unterscheiden, müssten diese beispielsweise durch Immunpräzipitation separiert und mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Nach einer Infektion werden Typ I Interferone von den infizierten Zellen sehr schnell gebildet, währenddessen IFN- γ von aktivierten Immunzellen wie T-Zellen, NK-Zellen und APCs erst später gebildet wird (Paun & Pitha 2007). Da ISG15 und die ISGylierung während der Immunantwort eine große Rolle spielen (Jeon et al 2010), könnte man auch davon ausgehen, dass sich Typ I und Typ II Interferon Stimulationen gegenseitig bedingen. Beispielsweise könnte die IFN- γ vermittelte ISGylierung wichtig sein, um die durch Typ I Interferone initiierte ISGylierung aufrecht zu erhalten oder fortzusetzen, damit die Infektion optimal bekämpft werden kann. Auch wenn Typ I und Typ II Interferone zu den immunmodulierenden Cytokinen gehören und sich ein Teil der durch sie induzierten Gene überschneidet, so erfüllen sie doch unterschiedliche Aufgaben innerhalb einer Immunantwort. Aus diesem Grund wäre es zusätzlich wahrscheinlich, dass als Konsequenz der Typ I und Typ II Interferon Stimulation unterschiedliche Proteine ISGyliert werden.

ISG15 und die ISGylierung beeinflussen auch die Ubiquitinierung. Seifert und Kollegen haben gezeigt, dass sowohl nach Typ I als auch nach Typ II Interferon Stimulation die Ubiquitinierung von Proteinen innerhalb von 8 Stunden stark zunimmt und dann nach ca. 24 Stunden wieder ihr Basallevel erreicht (Seifert et al 2010). Die Expression von freiem ISG15 und die Bildung der ISG15-Konjugate folgt einer biphasischen Kinetik, wobei freies ISG15 nach ca. 4 Stunden exprimiert wird und die ISG15-Konjugate nach 18 Stunden detektierbar sind (Abbildung 10). Die Zunahme und stärkste Akkumulation an ubiquitinierten Proteinen findet zu dem Zeitpunkt statt, an dem die Expression von freiem ISG15 beginnt. Die kontinuierliche Abnahme der ubiquitinierten Proteine erfolgt wiederum zu einer Zeit, in dem die ISGylierungsenzyme exprimiert werden und die ersten ISGylierten Proteine detektierbar sind. Der Basallevel der Ubiquitinierung ist dann erreicht, wenn die ISG15-Konjugate am stärksten akkumulieren. Der Beginn der Abnahme der ubiquitinierten Proteine nach 8 bis 12 Stunden könnte nicht nur durch den Abbau über das Proteasom erklärt werden, sondern auch durch den Fakt, dass ISG15 in der Lage ist, die Ubiquitinierung zu beeinflussen. Beispiele dafür sind das Ubiquitin E2-Enzym Ubc13, sowie der Interferon-regulatorische Faktor IRF3. Ubc13 verliert nach ISGylierung seine Fähigkeit Lys63-Ketten zu bilden (Zou et al 2005) und ISGyliertes IRF3 kann aufgrund der ISGylierung nicht mehr ubiquitiniert werden (Shi et al 2010).

Da die Bildung der ISG15-Konjugate viel später detektierbar ist als die Expression des freien ISG15, könnte aber auch mit den Funktionen des ISG15 in unkonjugierter Form zusammenhängen. Beispielsweise wird die Interaktion von der E3-Ligase Nedd8 und einem Ubiquitin-E2-Enzym-Komplex durch freies ISG15 blockiert (Malakhova & Zhang 2008). Da

freies ISG15 auch sezerniert werden kann und als Cytokin fungiert (Recht et al 1991), wäre es ebenfalls denkbar, dass der ISG15-Konjugation eine Sekretion des freien ISG15 vorgeschaltet ist und somit zu einer effizienteren Immunantwort beiträgt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Regulation von ISG15 und der ISGylierung in HeLa Zellen nach Typ I und Typ II Interferon Stimulation vergleichend untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Bildung der ISG15-Konjugate zwischen den Interferontypen auf Ebene der E3-Enzyme unterscheidet. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die bisher bekannten ISG15 E3-Ligasen Herc5 und TRIM25 nicht an der Interferon Typ II vermittelte ISGylierung beteiligt sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass an der die Interferon Typ I vermittelten ISGylierung neben Herc5 noch andere E3-Ligasen mitwirken müssen. Im Zuge dessen, konnten nach Typ I Interferon Stimulation UBE3A und nach Typ II Interferon Stimulation ARIH1 als potentielle neue ISG15 E3-Ligasen identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass ISG15 und die ISGylierung nicht nur nach Typ I Interferon Stimulation, sondern auch nach Typ II Interferon Stimulation eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen spielen könnte.

5 Literatur

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801
- Andersen JB, Hassel BA. 2006. The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: friend or foe? *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 411-21
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM. 1995. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11657-61
- Bates EE, Ravel O, Dieu MC, Ho S, Guret C, et al. 1997. Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur J Immunol* 27: 2471-7
- Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, Groothuis TA, de Waard H, et al. 2006. DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A. *Genes Dev* 20: 1343-52
- Billiau A. 2006. Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 381-409
- Bluyssen HA, Muzaffar R, Vliestra RJ, van der Made AC, Leung S, et al. 1995. Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5645-9
- Canaan A, Yu X, Booth CJ, Lian J, Lazar I, et al. 2006. FAT10/diubiquitin-like protein-deficient mice exhibit minimal phenotypic differences. *Mol Cell Biol* 26: 5180-9
- Catic A, Fiebigier E, Korbel GA, Blom D, Galardy PJ, Ploegh HL. 2007. Screen for ISG15-crossreactive deubiquitinases. *PLoS One* 2: e679
- Chang YG, Yan XZ, Xie YY, Gao XC, Song AX, et al. 2008. Different roles for two ubiquitin-like domains of ISG15 in protein modification. *J Biol Chem* 283: 13370-7
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, et al. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243: 1576-83
- Chen ZJ, Sun LJ. 2009. Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* 33: 275-86
- Chiu YH, Sun Q, Chen ZJ. 2007. E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10. *Mol Cell* 27: 1014-23
- Chu CY, Rana TM. 2006. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4: e210
- Ciechanover A. 2005. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ* 12: 1178-90
- Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A. 1980. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem* 255: 7525-8
- Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A. 1984. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* 24: 27-53
- D'Cunha J, Knight E, Jr., Haas AL, Truitt RL, Borden EC. 1996. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 211-5

- Dastur A, Beaudenon S, Kelley M, Krug RM, Huibregtse JM. 2006. Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem* 281: 4334-8
- Desai SD, Haas AL, Wood LM, Tsai YC, Pestka S, et al. 2006. Elevated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway. *Cancer Res* 66: 921-8
- Deshaies RJ, Joazeiro CA. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78: 399-434
- Ebstein F, Lange N, Urban S, Seifert U, Kruger E, Kloetzel PM. 2009. Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1205-15
- Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Kikkert M, Taylor SL, Bridgen A, et al. 2007. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell Host Microbe* 2: 404-16
- Geiss-Friedlander R, Melchior F. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 947-56
- Genin P, Vaccaro A, Civas A. 2009. The role of differential expression of human interferon- α genes in antiviral immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 283-95
- Giannakopoulos NV, Luo JK, Papov V, Zou W, Lenschow DJ, et al. 2005. Proteomic identification of proteins conjugated to ISG15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 496-506
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 11-5
- Gong P, Canaan A, Wang B, Leventhal J, Snyder A, et al. 2010. The ubiquitin-like protein FAT10 mediates NF-kappaB activation. *J Am Soc Nephrol* 21: 316-26
- Gough DJ, Levy DE, Johnstone RW, Clarke CJ. 2008. IFNgamma signaling-does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 383-94
- Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H. 1987. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. *J Biol Chem* 262: 11315-23
- Haas AL, Warms JV, Rose IA. 1983. Ubiquitin adenylate: structure and role in ubiquitin activation. *Biochemistry* 22: 4388-94
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5: 461-6
- Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 276: 33111-20
- Hershko A, Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61: 761-807
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. 1980. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 1783-6
- Hochrainer K, Mayer H, Baranyi U, Binder B, Lipp J, Kroismayr R. 2005. The human HERC family of ubiquitin ligases: novel members, genomic organization, expression profiling, and evolutionary aspects. *Genomics* 85: 153-64
- Hochstrasser M. 2009. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458: 422-9
- Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. 2002. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419: 135-41

- Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, et al. 2008. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol* 26: 549-51
- Jaks E, Gavutis M, Uze G, Martal J, Piehler J. 2007. Differential receptor subunit affinities of type I interferons govern differential signal activation. *J Mol Biol* 366: 525-39
- Jeon YJ, Yoo HM, Chung CH. 2010. ISG15 and immune diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 485-96
- Jin L, Williamson A, Banerjee S, Philipp I, Rape M. 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* 133: 653-65
- Katze MG, Fornek JL, Palermo RE, Walters KA, Korth MJ. 2008. Innate immune modulation by RNA viruses: emerging insights from functional genomics. *Nat Rev Immunol* 8: 644-54
- Kerscher O, Felberbaum R, Hochstrasser M. 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-80
- Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, et al. 2006. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *Embo J* 25: 4877-87
- Kitareewan S, Pitha-Rowe I, Sekula D, Lowrey CH, Nemeth MJ, et al. 2002. UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RARalpha degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3806-11
- Kleiger G, Saha A, Lewis S, Kuhlman B, Deshaies RJ. 2009. Rapid E2-E3 assembly and disassembly enable processive ubiquitylation of cullin-RING ubiquitin ligase substrates. *Cell* 139: 957-68
- Knight E, Jr., Cordova B. 1991. IFN-induced 15-kDa protein is released from human lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 146: 2280-4
- Komander D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* 37: 937-53
- Komander D, Clague MJ, Urbe S. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 550-63
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, et al. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-9
- Kumar S, Kao WH, Howley PM. 1997. Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem* 272: 13548-54
- Lackner DH, Bahler J. 2008. Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes. *Int Rev Cell Mol Biol* 271: 199-251
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, et al. 2007. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1371-6
- Lew DJ, Decker T, Strehlow I, Darnell JE. 1991. Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons. *Mol Cell Biol* 11: 182-91
- Liu C, Chang R, Yao X, Qiao WT, Geng YQ. 2009. ISG15 expression in response to double-stranded RNA or LPS in cultured Fetal bovine lung (FBL) cells. *Vet Res Commun* 33: 723-33
- Liu M, Li XL, Hassel BA. 2003. Proteasomes modulate conjugation to the ubiquitin-like protein, ISG15. *J Biol Chem* 278: 1594-602
- Loeb KR, Haas AL. 1992. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267: 7806-13

- Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC, Zhang DE. 2003. High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem* 278: 16608-13
- Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, Ritchie KJ, Zhang DE. 2002. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* 277: 9976-81
- Malakhova OA, Zhang DE. 2008. ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *J Biol Chem* 283: 8783-7
- Martensen PM, Justesen J. 2004. Small ISGs coming forward. *J Interferon Cytokine Res* 24: 1-19
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3: REVIEWS0004
- Moynihan TP, Ardley HC, Nuber U, Rose SA, Jones PF, et al. 1999. The ubiquitin-conjugating enzymes UbcH7 and UbcH8 interact with RING finger/IBR motif-containing domains of HHARI and H7-AP1. *J Biol Chem* 274: 30963-8
- Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S. 2006. A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 540-6
- Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, et al. 2001. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 1150-6
- Narasimhan J, Wang M, Fu Z, Klein JM, Haas AL, Kim JJ. 2005. Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15. *J Biol Chem* 280: 27356-65
- Niwa J, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G. 2001. A novel centrosomal ring-finger protein, dorf, mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 706-13
- Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM. 2006. Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1440-5
- Okumura A, Pitha PM, Harty RN. 2008. ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3974-9
- Okumura F, Zou W, Zhang DE. 2007. ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes Dev* 21: 255-60
- Osiak A, Utermohlen O, Niendorf S, Horak I, Knobeloch KP. 2005. ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol* 25: 6338-45
- Padovan E, Terracciano L, Certa U, Jacobs B, Reschner A, et al. 2002. Interferon stimulated gene 15 constitutively produced by melanoma cells induces e-cadherin expression on human dendritic cells. *Cancer Res* 62: 3453-8
- Patnaik A, Chau V, Wills JW. 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13069-74
- Paun A, Pitha PM. 2007. The innate antiviral response: new insights into a continuing story. *Adv Virus Res* 69: 1-66
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8-32
- Pickart CM. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-33
- Pincetic A, Kuang Z, Seo EJ, Leis J. 2010. The interferon-induced gene ISG15 blocks retrovirus release from cells late in the budding process. *J Virol* 84: 4725-36

- Pitha-Rowe I, Hassel BA, Dmitrovsky E. 2004. Involvement of UBE1L in ISG15 conjugation during retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia. *J Biol Chem* 279: 18178-87
- Pitha-Rowe IF, Pitha PM. 2007. Viral defense, carcinogenesis and ISG15: novel roles for an old ISG. *Cytokine Growth Factor Rev* 18: 409-17
- Raasi S, Schmidtke G, de Giuli R, Groettrup M. 1999. A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 29: 4030-6
- Recht M, Borden EC, Knight E, Jr. 1991. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. *J Immunol* 147: 2617-23
- Reich N, Evans B, Levy D, Fahey D, Knight E, Jr., Darnell JE, Jr. 1987. Interferon-induced transcription of a gene encoding a 15-kDa protein depends on an upstream enhancer element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6394-8
- Sadler AJ, Williams BR. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8: 559-68
- Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14: 778-809, table of contents
- Schmidtke G, Kalveram B, Weber E, Bochtler P, Lukasiak S, et al. 2006. The UBA domains of NUB1L are required for binding but not for accelerated degradation of the ubiquitin-like modifier FAT10. *J Biol Chem* 281: 20045-54
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-89
- Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, et al. 2010. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell in press*
- Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, et al. 2010. Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol Cell Biol* 30: 2424-36
- Shtrichman R, Samuel CE. 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol* 4: 251-9
- Takaoka A, Yanai H. 2006. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8: 907-22
- Takeuchi T, Inoue S, Yokosawa H. 2006a. Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 473-7
- Takeuchi T, Iwahara S, Saeki Y, Sasajima H, Yokosawa H. 2005. Link between the ubiquitin conjugation system and the ISG15 conjugation system: ISG15 conjugation to the UbcH6 ubiquitin E2 enzyme. *J Biochem* 138: 711-9
- Takeuchi T, Kobayashi T, Tamura S, Yokosawa H. 2006b. Negative regulation of protein phosphatase 2Cbeta by ISG15 conjugation. *FEBS Lett* 580: 4521-6
- Tang Y, Zhong G, Zhu L, Liu X, Shan Y, et al. 2010. Herc5 attenuates influenza A virus by catalyzing ISGylation of viral NS1 protein. *J Immunol* 184: 5777-90
- Taylor JL, D'Cunha J, Tom P, O'Brien WJ, Borden EC. 1996. Production of ISG-15, an interferon-inducible protein, in human corneal cells. *J Interferon Cytokine Res* 16: 937-40
- van Wijk SJ, de Vries SJ, Kemmeren P, Huang A, Boelens R, et al. 2009. A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system. *Mol Syst Biol* 5: 295
- Wang Y, Dasso M. 2009. SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *J Cell Sci* 122: 4249-52

- Wesoly J, Szweykowska-Kulinska Z, Bluysen HA. 2007. STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta Biochim Pol* 54: 27-38
- Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, et al. 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* 137: 133-45
- Yew NS, Zhao H, Wu IH, Song A, Tousignant JD, et al. 2000. Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther* 1: 255-62
- Yin H, Gui Y, Du G, Frohman MA, Zheng XL. 2010. Dependence of phospholipase D1 multi-monoubiquitination on its enzymatic activity and palmitoylation. *J Biol Chem*
- Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175: 2851-8
- Yuan W, Krug RM. 2001. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J* 20: 362-71
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, et al. 2004. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7578-82
- Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. 2005. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10200-5
- Zou W, Papov V, Malakhova O, Kim KI, Dao C, et al. 2005. ISG15 modification of ubiquitin E2 Ubc13 disrupts its ability to form thioester bond with ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 61-8
- Zou W, Zhang DE. 2006. The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *J Biol Chem* 281: 3989-94

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
AMP	Adenosinmonophosphat
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	„copy“ Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
FLAG	Oktapeptid mit der Sequenz DYKDDDDK
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
Gly	Glycin
h	Stunde
HA	Peptid aus Hemagglutinin mit der Sequenz YPYDVPDYA
IFN	Interferon
IP	Immunpräzipitation
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
ISRE	interferon-stimulated response element
Kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

Lys	Lysin
M	Molarität (Mol/l)
m	Meter
m, μ , n	milli, micro, nano
max.	maximal
min	Minute
min.	mindestens
miRNA	micro Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PP _i	Pyrophosphat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
siRNA	„small interfering“ Ribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
TEMED	Tetramethylethylenamin
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

Publikationen

Publizierte Artikel

Ebstein F, **Lange N**, Urban S, Seifert U, Kruger E, Kloetzel PM. 2009

Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1205-15

Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, Bech-Otschir D, Voigt A, Schröter F, Prozorovski T, **Lange N**, Steffen J, Rieger M, Kuckelkorn U, Aktas O, Kloetzel PM, Krueger E. 2010

Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* in press

Artikel in Vorbereitung

Lange N, Ebstein F, Kloetzel PM

Divergence occurs in gene regulation of the ISG15 conjugation machinery between type I and type II interferon.

Vorträge

Lange N, Ebstein F, Seifert U, Kloetzel PM

Functional dissection of the ISG15 conjugation machinery reveals distinct ISG15 modification dynamics in response to interferons

19th European Students' Conference,

29.September-3.Oktober 2008 Berlin, Deutschland

Lange N, Ebstein F, Kloetzel PM

Evidence for a Herc5-independent ISGylation after IFN γ induction

2nd Annual Meeting of the SPP1365, The UbF Network,

14.-16.April 2010 Berlin-Zeuthen, Deutschland

Poster

Lange N, Wiemhoefer A, Ebstein F, Seifert U, Kloetzel PM

Functional dissection of the ISG15 conjugation machinery reveals distinct ISG15 modification dynamics in response to interferons

Cold Spring Harbor meeting: The Ubiquitin Family,

21.-25.April 2009 Cold Spring Harbor, New York, USA

Lange N, Ebstein F, Kloetzel PM

Differences in the ISG15 modification machinery after type I and type II interferon induction

Joint Research Conference of the IAS-ISF: “Biology of the Ubiquitin and the Ubiquitin-Like Systems”,

14.-19.März 2010 Jerusalem, Israel

Berlin, 17.August 2010

(Nicole Lange)

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Thema in seinem Institut zu bearbeiten und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank meinem Betreuer Herrn Dr. Frédéric Ebstein der mir nicht nur die Immunologie näher gebracht hat, sondern mich auch bei allen praktischen und theoretischen Fragestellungen intensiv unterstützt und mir viele Tipps und Anregungen gegeben hat. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Ulrike Seifert bedanken, in deren Arbeitsgruppe ich in angenehmer Atmosphäre meine Doktorarbeit anfertigen konnte. Vielen Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Kloetzel und im speziellen an das gesamte Labor 007 (Bond) insbesondere an Elke Bürger die immer ein offenes Ohr hatte und mir unter anderem viele hilfreiche Klonierungstipps gegeben hat.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei allen Gutachtern und Mitgliedern des Promotionsausschusses für Ihre Mühe bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt allen ehemaligen und jetzigen Doktoranden mit denen ich viele schöne Stunden im Institut, ums Institut herum und außerhalb des Instituts verbringen durfte. Danke Melanie R., Sandra, Melanie K., Janos, Melanie D.B., Tobias, Martin und Sabrina für den herzlichen Einstand in das Doktorandendasein, was vieles erleichtert hat. Ein großes Dankeschön gilt auch Julia, Annika, Caro und Anne mit denen ich bis zum Schluss viele witzige Erlebnisse, interessante Diskussionen und überhaupt viel Freude und Spaß hatte.

Auch außerhalb des Labors haben viele meiner Freunde zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, deshalb möchte ich mich hier im speziellen bei Melli, Maren, Mirco und Birgit bedanken. Ihr habt immer für abwechslungsreiche Ablenkung gesorgt und mich immer wieder in schwierigen Phasen motiviert. Danke schön!

Ganz besonders möchte ich mich jedoch bei meinem Freund Lars bedanken, der mir immer zur Seite stand und mir mit seiner Geduld und seiner Zuversicht eine große Stütze war.

Zu guter Letzt bedanke ich mich ganz doll bei meinen Eltern, ohne sie wäre ich nie soweit gekommen! Danke, dass es Euch gibt und Ihr mich immer ausnahmslos und in jeder Lebensphase unterstützt habt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, 17.August 2010

(Nicole Lange)